

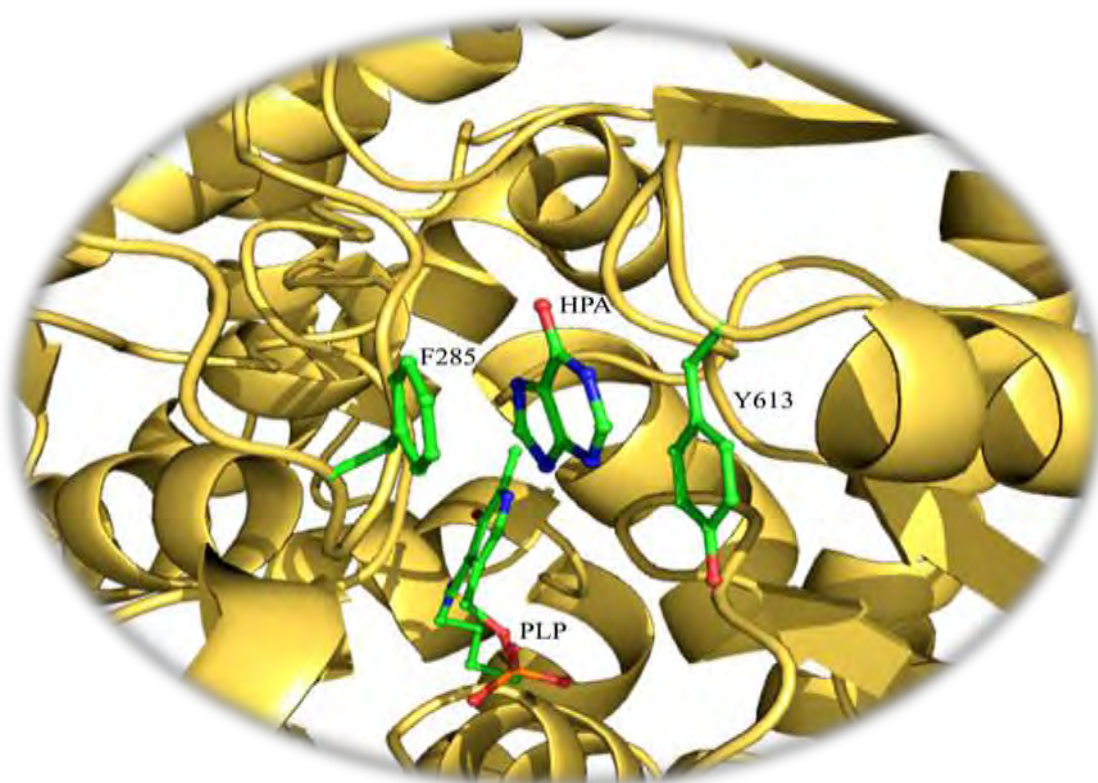


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ
ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΑΡΓΥΡΗ ΣΤΑΜΑΤΟΥΛΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2012

Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κομιώτης Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2011-Φεβρουάριος 2012, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Οι συμβουλές, η υπομονή, η ενθάρρυνση, η καθοδήγηση και η βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια υπήρξαν πολύτιμες.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Δρ. Κοντού Μαρία για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την αμέριστη εμπιστοσύνη της στο πρόσωπο μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ. Κομιώτη Δημήτρη για την συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Σκαμνάκη Βασιλική, η οποία ανεξάρτητα από τις επαγγελματικές της υποχρεώσεις, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Abstract.....	7
Περίληψη.....	8
Εισαγωγή.....	9
1.Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.1Ενδοκρινικό σύστημα.....	9
1.2 Πάγκρεας.....	10
1.3 Ινσουλίνη.....	11
1.4 Σακχαρώδης διαβήτης	12
1.5 Υποινσουλινισμός	13
1.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	13
1.5.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	15
2. Βασικές γνώσεις.....	16
2.1 Γλυκόζη.....	16
2.2 Γλυκογόνο.....	18
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	19
2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης	20
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	22
2.3.1 Γενικά	22
2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	24
2.3.3 Κρυσταλλική δομή της GP.....	29
2.3.4 Κέντρα σύνδεσης της GP.....	31
3. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	33
4.1 Αρχές ενζυμικής κινητικής	35
4.2 Αναστολείς ενζυμικής αντίδρασης	36
4.2.1 Συναγωνιστική αναστολή	37
4.2.2 Πειράματα ανταγωνισμού.....	39
5. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	40
5.1 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	41
5.2 Στάδια κρυστάλλωσης.....	42
5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.....	45
5.4 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης.....	47
5.5 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης.....	48
5.5.1 Γενικά.....	48
5.5.2 Ακτίνες X (Röntgen).....	49
5.5.3 Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές.....	50
5.5.4 Έλεγχος του δομικού μοντέλου.....	55
Σκοπός της εργασίας.....	57
Υλικά και μέθοδοι.....	59
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	59
2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου b.....	62
2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	62
2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	63
2.3 Προσδιορισμός K_i αναστολέα.....	64
2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb- γλυκογόνου.....	65
2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος.....	65

2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος.....	66
2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	67
2.5 Παρασκευή τυφλών.....	68
2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit	68
3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	69
4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.	71
5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X.....	72
6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	74
Αποτελέσματα –Συζήτηση.....	76
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	76
2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	77
2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	77
2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων Αλλοπουρινόλης-υποξανθίνης.....	79
3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	81
Βιβλιογραφία.....	84

Abstract

Design of glucose analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase, as potential hypoglycemic drugs. Kinetic and crystallographic studies.

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Rational structure-based drug design has exploited a number of promising targets for the treatment of T2D. Hepatic glycogen phosphorylase is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle (GPb) has been employed as molecular target for the study of 2 purine analogues, hypoxanthine and allopurinol, targeting the inhibitor site of the enzyme. Crystallographic studies were carried out for one of these compounds using an in-house X-ray source.

In specific, the kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that allopurinol and hypoxanthine inhibit the enzymatic activity of GPb with K_i values of 1.06 and 2.98 mM, respectively. To reveal the structural basis of hypoxanthine's potency, crystallographic analysis of the GPb-hypoxanthine complex was performed. The structure of GPb-hypoxanthine was determined at 2.3 Å resolution and the ligand was found bound at the inhibitor site of the enzyme forming 2 hydrogen bonds and engaging in 87 van der Waals interactions with residues at the active site of the enzyme. There, hypoxanthine exerts its inhibitory action by stabilizing the T state conformation of the enzyme, and by blocking the entrance of the substrate to the active site.

Περίληψη

Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες παθήσεις και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Με στόχο τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη μοριακή δομή (ή ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων) έχει θέσει ως στόχο εξειδικευμένων μορίων, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, η μυϊκή φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) χρησιμοποιείται για την κινητική μελέτη 2 αναλόγων πουρίνης, της υποξανθίνης και της αλλοπουρινόλης, οι οποίες επιλέχθηκαν με στόχο το κέντρο αναστολής του ενζύμου. Για την υποξανθίνη πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικά πειράματα με χρήση ακτινοβολίας X από σύστημα στο εργαστήριο.

Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι η αλλοπουρινόλη και η υποξανθίνη αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου με σταθερές αναστολής K_i , 1.06 και 2.98 mM, αντίστοιχα.

Για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων που αφορούν στην υποξανθίνη πραγματοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική μελέτη αυτής ως συμπλόκου με την GPb. Η δομή του συμπλόκου GPb-υποξανθίνη προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 2.3 Å. Η υποξανθίνη βρέθηκε προσδεμένη στο κέντρο αναστολής του ενζύμου όπου σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου και εμπλέκεται σε 87 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξικά κατάλοιπα. Η υποξανθίνη με τη σύνδεση της στο κέντρο αυτό σταθεροποιεί την T (ανενεργή) διαμόρφωση του ενζύμου και φράσσει την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σακχαρώδης διαβήτης.

1.1. Ενδοκρινικό σύστημα.

Η επικοινωνία και η συνεργασία των διαφόρων οργάνων ή ιστών μεταξύ τους επιτυγχάνονται με το νευρικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Το νευρικό σύστημα είναι το «ενσύρματο» σύστημα επικοινωνίας, ενώ το ενδοκρινικό σύστημα είναι το «ασύρματο» σύστημα. Και τα δύο αυτά συστήματα συνεργάζονται και αλληλοεπηρεάζονται.

Οι ενδοκρινείς αδένες είναι αδένες χωρίς εκφορητικό πόρο. Οι χημικές ουσίες, που παράγονται σ' αυτούς, εκκρίνονται απευθείας στο αίμα και ονομάζονται ορμόνες. Αυτός είναι ένας γενικός κλασικός ορισμός, που χαρακτηρίζει τις περισσότερες ορμόνες. Δεν είναι, όμως, πλήρης. Θα πρέπει να διευρυνθεί για να περιλάβει και ουσίες, όπως είναι οι προσταγλανδίνες για παράδειγμα, που απαντούν σε πολλούς ιστούς και δρουν, κυρίως, τοπικά. Επίσης, η παλιά αντίληψη ότι οι ενδοκρινείς αδένες εκκρίνουν ορμόνες και οι νευρικές ίνες ελευθερώνουν χημικούς μεταβιβαστές έχει μεταβληθεί. Υπάρχουν πεπτίδια εντοπισμένα τόσο σε νευρικά όσο και σε ενδοκρινή κύτταρα, που παρουσιάζουν ορμονική δράση. Στην τελευταία περίπτωση πρόκειται για ένα διάχυτο νευροενδοκρινικό σύστημα (Αθ. Σμοκοβίτης 2004) .

Οι ορμόνες ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες χημικών ουσιών (πίνακας 1^ο). Γενικά, όμως, μπορεί να ταξινομηθούν από χημικής σύστασης σε τρεις, κυρίως, ομάδες .

1. Αμίνες (με πρόδρομη ουσία το αμινοξύ τυροσίνης).
2. Πεπτίδια και πρωτεΐνες.
3. Στεροειδή (με κοινή πρόδρομη ουσία τη χολοστερόλη).

Αμίνες:	Δοπαμίνη, ανδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, μελατονίνη.
Ιωδιοθυρονίνες:	Θυροξίνη τριιωδιοθυρονίνη.

Μικρά πεπτίδια:	Αντιδιουρητική ορμόνη, ωκυτοκίνη, μελανοχρωστικοτρόπες ορμόνες, αγγειοτασίνη I και II κ.α.
Πρωτεΐνες:	Ινσουλίνη, γλυκαγόνη, αυξητική ορμόνη, προλακτίνη, παραθορμόνη, καλσιτονίνη, επινεφριδιοφλοιοτρόπος ορμόνη κ.α.
Γλυκοπρωτεΐνες:	Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη, ωχρινοποιητική ορμόνη, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, κ.α.
Στεροειδή:	Οιστρογόνα, προγεστερόνη, ανδρογόνα, γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή, χολοκαλσιφερόλη κ.α.

Πίνακας 1^ο: Χημική φύση των κυτταρικών ορμονών.

1.2. Πάγκρεας.

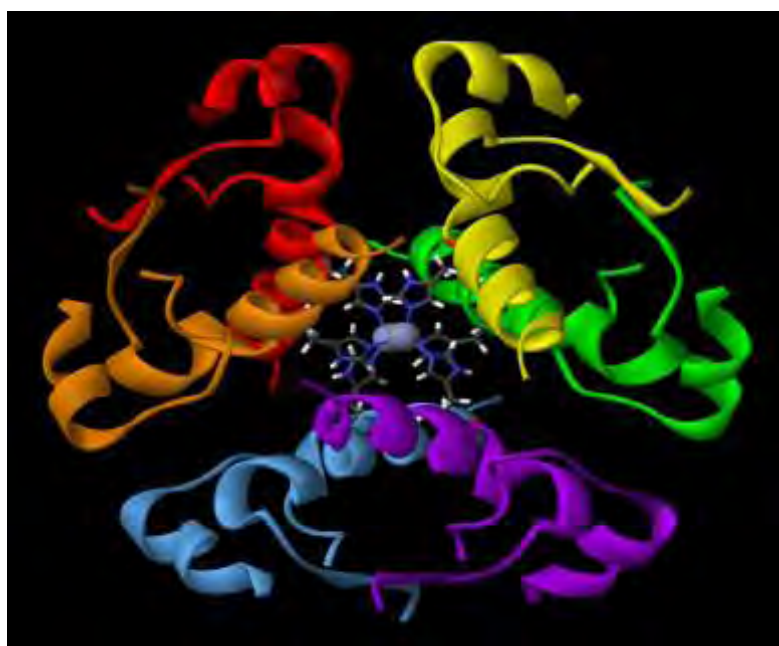
Το πάγκρεας είναι συγχρόνως ενδοκρινής και εξωκρινής αδένας. Η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος παράγει το παγκρεατικό υγρό. Η ενδοκρινής μοίρα παράγει τις ορμόνες ινσουλίνη, γλυκαγόνη, σωματοστατίνη και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο.

Η ενδοκρινής μοίρα αποτελείται από διάσπαρτες ομάδες κυττάρων, τα νησίδια του Langerhans. Ο αριθμός των νησίδων αυτών ανέρχεται σε 1-2 εκατομμύρια στο πάγκρεας του ανθρώπου. Τα νησίδια δέχονται νευρικές ίνες από το παρασυμπαθητικό (πνευμονογαστρικό) και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Στα θηλαστικά (με εξαίρεση τον ινδόχοιρο) τα νησίδια του Langerhans αποτελούνται από τέσσερις τύπους κυττάρων: α, β, δ και F ή PP, με διαφορά μορφολογικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό φυσιολογικό ρόλο. Τα κύτταρα αυτά δεν είναι τυχαία κατανεμημένα μέσα στα νησίδια. Τα β-κύτταρα, που είναι και τα πολυαριθμότερα, καταλαμβάνουν την κεντρική μοίρα του νησιδίου, ενώ τα α-κύτταρα και τα F ή PP κύτταρα την περιφερική μοίρα. Τα δ-κύτταρα βρίσκονται ανάμεσα στα α-κύτταρα και στα β-κύτταρα.

Τα α εκκρίνουν την ορμόνη γλυκαγόνη, τα κύτταρα β την ινσουλίνη, τα δ τη σωματοστατίνη και τα κύτταρα F ή PP το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (Αθ. Σμοκοβίτης 2004).

1.3. Ινσουλίνη.

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους περίπου 6 kDa. Προέρχεται από ένα άλλο πολυπεπτίδιο, την προΐνσουλίνη που είναι βιολογικά αδρανές.



Εικόνα 1^η: Τρισδιάστατη μορφή ινσουλίνης.

Ο φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης είναι να μειώνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Και αυτό γιατί αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους μυς, το λιπώδη ιστό και από το ήπαρ, μειώνει το ρυθμό γλυκογονόλυσης (αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη), αυξάνει τη γλυκογονογένεση (παραγωγή γλυκογόνου από γλυκόζη), και μειώνει τη γλυκονεογένεση (σχηματισμός γλυκόζης από μη υδατανθρακούχες ουσίες).

Επίσης επιδρά άμεσα στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς αυξάνει τη δίοδο των περισσότερων αμινοξέων από την κυτταρική μεμβράνη και τη σύνθεση RNA, ενώ η έμμεση επίδραση της έγκειται στο γεγονός ότι αυξάνει τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τα κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας, κι έτσι εξοικονομούνται πρωτεΐνες. Ακόμα η ινσουλίνη επηρεάζει και τον μεταβολισμό των

λιπιδίων, καθώς αυξάνει την αποθήκευση λίπους και παρεμποδίζει την κινητοποίηση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Γενικά τα όργανα ή οι ιστοί που θεωρούνται «στόχοι» της ινσουλίνης είναι το ήπαρ, οι μύες, ο λιπώδης ιστός, ο μαστός, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα περιφερικά νεύρα κ.α. (Σμοκοβίτης 2004)

Η έκκριση της ινσουλίνης επηρεάζεται, κατ' αρχήν, από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης (αλλά και την σύνθεση ινσουλίνης). Αυτή η αύξηση προκαλείται και από τους υδατάνθρακες μαννόζης και φρουκτόζης όπως ακόμα και με την αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων στο αίμα. Η έκκριση ινσουλίνης είναι μεγαλύτερη αμέσως μετά την πρόσληψη τροφής και μειώνεται κατά τη νηστεία. Και τα κετονικά σώματα μπορούν να αυξήσουν την έκκριση μόνο όμως όταν η συγκέντρωσή τους στο αίμα είναι αρκετά μεγάλη. Η έκκριση ινσουλίνης διεγείρεται από ορμόνες του γαστρεντερικού σωλήνα. Επίσης, η αυξητική ορμόνη της υπόφυσης και τα γλυκοκορτικοειδή των επινεφριδίων αυξάνουν την ανταπόκριση των β-κύτταρων του παγκρέατος στην υπογλυκαιμία και σε άλλα ερεθίσματα και συντελούν στην αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης. Ανάλογο ρόλο παίζει και η θυροξίνη αλλά και η παρουσία Ca^{++} σε επαρκείς ποσότητες στο εξωκυτταρικό υγρό. Τέλος, η διέγερση του παρασυμπαθητικού (πνευμονογαστρικού) αυξάνει την έκκριση της ινσουλίνης, ενώ η διέγερση του συμπαθητικού την αναστέλλει.

Η ινσουλίνη μετά την έκκρισή της από το πάγκρεας και πριν φτάσει στην περιφερική (συστηματική) κυκλοφορία διέρχεται αναγκαστικά από το ήπαρ, όπου μπορεί να αδρανοποιηθεί το 40% περίπου της ινσουλίνης.

Η ημιπερίοδος ζωής της ινσουλίνης στο αίμα είναι μόνο μερικά λεπτά (και οπωσδήποτε όχι περισσότερο από 30 λεπτά). Σημαντικές ποσότητες ινσουλίνης δεσμεύονται στο ήπαρ και στους νεφρούς.

1.4. Σακχαρώδης διαβήτης.

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Τα επίπεδα γλυκόζης, στα υγιή άτομα, ρυθμίζονται από τη δράση της ινσουλίνης. Στο ΣΔ, το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου 1), είτε η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης

τύπου 2) οδηγώντας έτσι σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται και ως διαβήτης των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ.

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>].

1.5. Υποϊνσουλινισμός.

Η μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, σε μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, σε αντισώματα κατά της ινσουλίνης, σε αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και σε δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία. (Φυσιολογία Σμοκοβίτη 2004)

Η κλινική εικόνα από την ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι γνωστή ως **σακχαρώδης διαβήτης**.

1.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή ινσουλινοεξαρτώμενος.

Προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως «νεανικός διαβήτης». Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει.

Στον διαβήτη τύπου I απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση.

Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης/ινσουλίνης στον διαβήτη προάγει επίσης τη διάσπαση του γλυκογόνου. Έτσι παράγεται περίσσεια γλυκόζης από το ήπαρ η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα (γλυκοζουρία) όταν η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια. Η απεκρινόμενη γλυκόζη συνοδεύεται από νερό, οπότε ο διαβητικός που δεν λαμβάνει κάποια αγωγή πεινά και διψά (πολυφαγία, πολυδιψία).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I αποτελεί παράδειγμα πολυπαραγοντικής κληρονομικότητας, η οποία ασχολείται με χαρακτηριστικά και νοσήματα που δεν κληρονομούνται με απλή Μεντελική κληρονομικότητα, ούτε έχουν σχέση με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλά και πάλι, στην αιτιολογία τους παίζουν ρόλο διάφοροι γενετικοί παράγοντες.

Η νόσος εντοπίζεται σε οικογένειες: 10% των ασθενών έχουν έναν προσβεβλημένο αδερφό, ο κίνδυνος νόσησης των αδερφών ενός διαβητικού ή των απογόνων ενός πατέρα με σακχαρώδη διαβήτη είναι 10 φορές μεγαλύτερος από αυτόν στο γενικό πληθυσμό και η συμπτωτικότητα της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους είναι 25-30% περίπου 5 φορές υψηλότερη από αυτή σε διζυγωτικούς διδύμους. Έχει ταυτοποιηθεί ένας γενετικός τόπος στην περιοχή HLA, γνωστού ως IDDM-1 που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ευπάθειας για την νόσο. Ένας δεύτερος σημαντικός γενετικός τόπος, γνωστός ως IDDM-2, είναι το ίδιο το γονίδιο της ινσουλίνης. Τα αλληλόμορφα που καθιστούν ένα άτομο ευπαθές στη νόσο φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης.

Με την χρήση μεθόδων σάρωσης του γονιδιώματος έχουν βρεθεί 11 ακόμα γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ευπάθεια ενός ατόμου στον σακχαρώδη διαβήτη (T. Gelehrter et al 2003)

1.5.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό με τον οποίο αυξάνονται οι περιπτώσεις εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, θα είναι ένα από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας. (Diamond, 2003). Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή παράγοντα προδιάθεσης, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκα.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και **"μη ινσουλινεξαρτώμενος"** (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της.

Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης (υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.

Ο Διαβήτης Τύπου II συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα και τις επιπλοκές να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Συχνά δεν υπάρχουν συμπτώματα όταν γίνεται η διάγνωση του Διαβήτη Τύπου II. Η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α -γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. (Oikonomakos 2001).

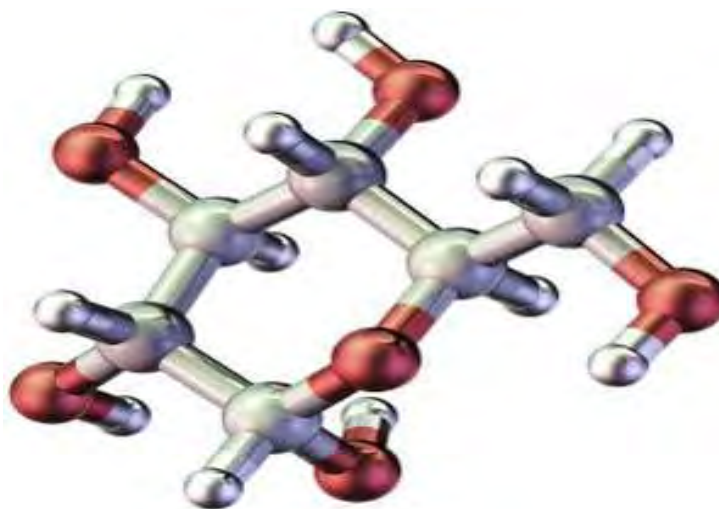
Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες (Morral 2003). Υπάρχει λοιπόν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Oikonomakos *et al.*, 2001].

2. Βασικές γνώσεις.

2.1. Γλυκόζη.

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο

εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α -D-γλυκοπυρανόζη και η β -D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer,1997].



Εικόνα 2^η: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000]. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer,1997].

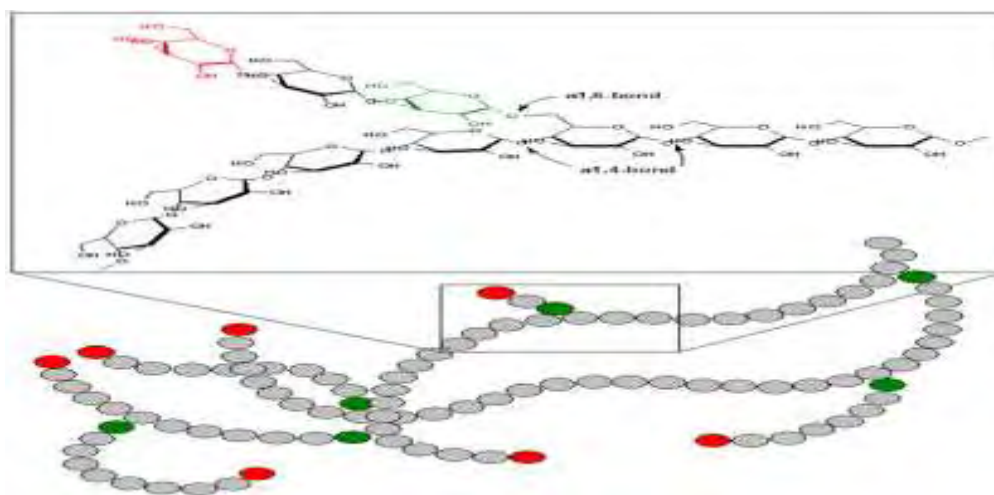
Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί

μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης (McArdle *et al.*, 2000).

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Martin *et al.*, 1998). Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από τη δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού (McArdle *et al.*, 2000).

2.2. Γλυκογόνο.

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Stryer, 1997).



Εικόνα 3^η: Η δομή του γλυκογόνου.

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμοι μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια

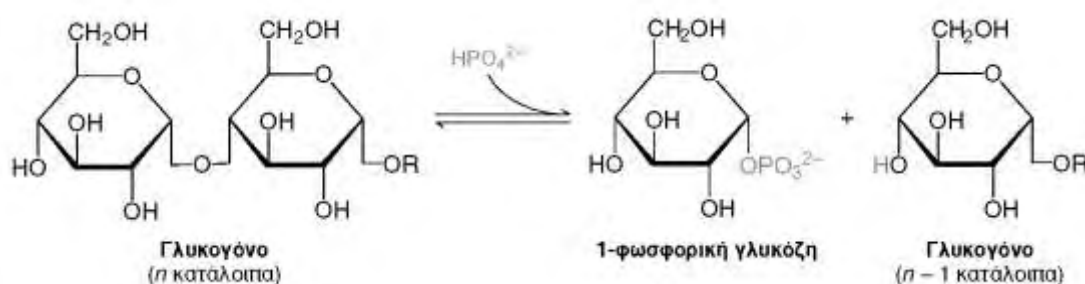
καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. (Stryer 1997).

2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. (Εικόνα 4^η)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].



Εικόνα 4^η : Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 1997).

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

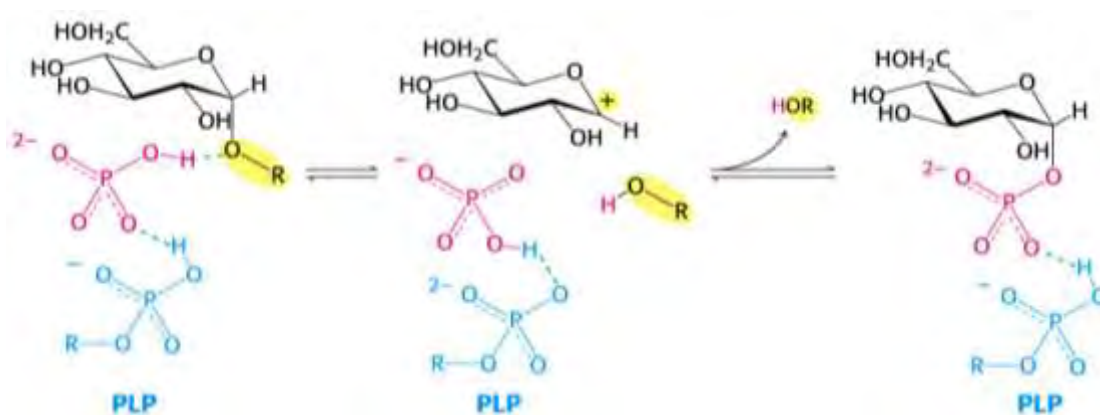
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. (Stryer 1997)

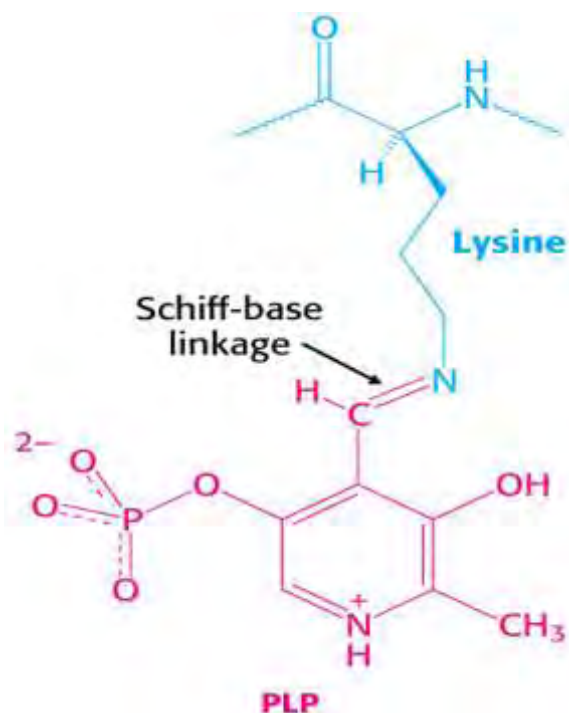
Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997]. (Εικόνα 5).

Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



Εικόνα 5^η : Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ε-NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 6). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).



Εικόνα 6^η : Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

2.3.1 Γενικά.

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-

φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης (Stryer 1997).

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα του ενζύμου (Oikonomakos *et al.*, 1992). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση (McLaughlin 1984).

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπομενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. (Stryer 1997)

Φυσιολογικά η δραστηριότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από έναν ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G₁(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). (Rath et al.2000)

2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται **αλλοστερική μετάπτωση**. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να

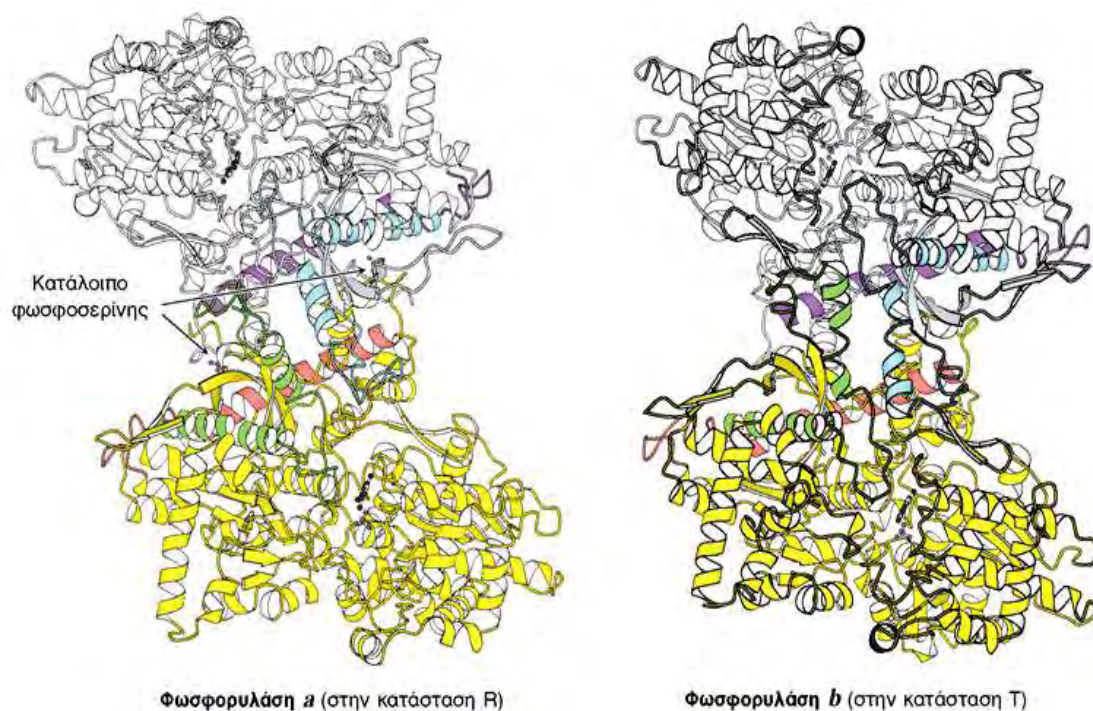
έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες [Monod *et al.*, 1965]).

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod *et al.*, 1965, Oikonomakos *et al.*, 1977].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 7). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν έναν βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο

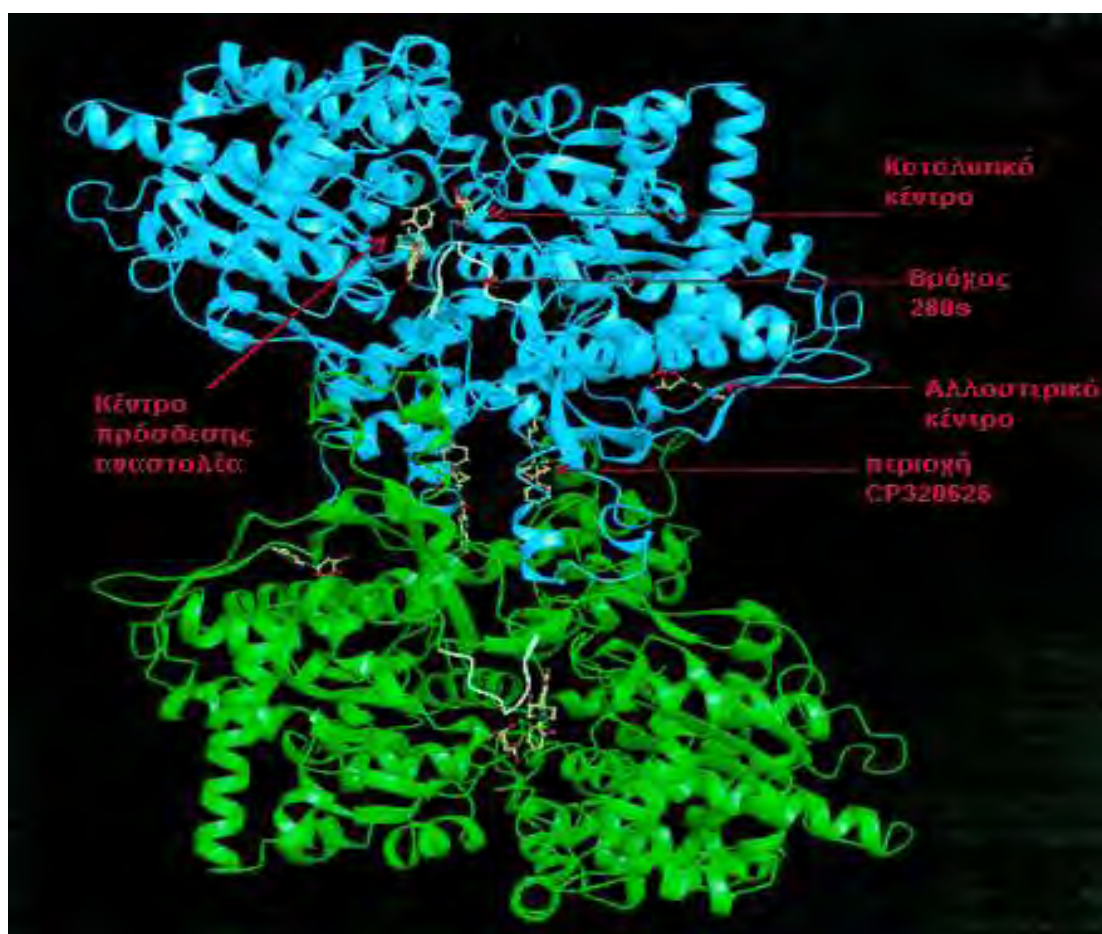
προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. (Stryer 1997).



Εικόνα 7^η : Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. (Stryer 1997). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση *a* είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6- φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

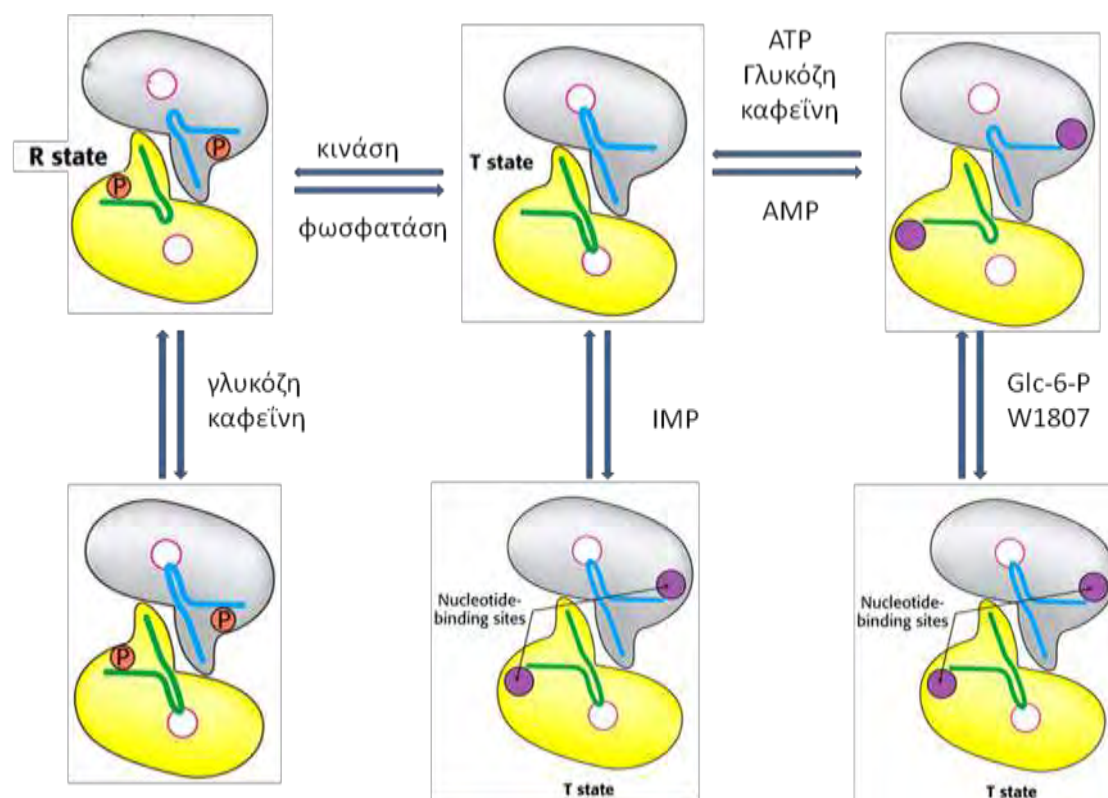
Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP (Oikonomakos 2001).



Εικόνα 8^η : Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι αναστολείς είναι προσδεδεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s με λευκό χρώμα.

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Johnson *et al.*, 1989) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9^η: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης (Stryer 1997).

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο

των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer 1997).

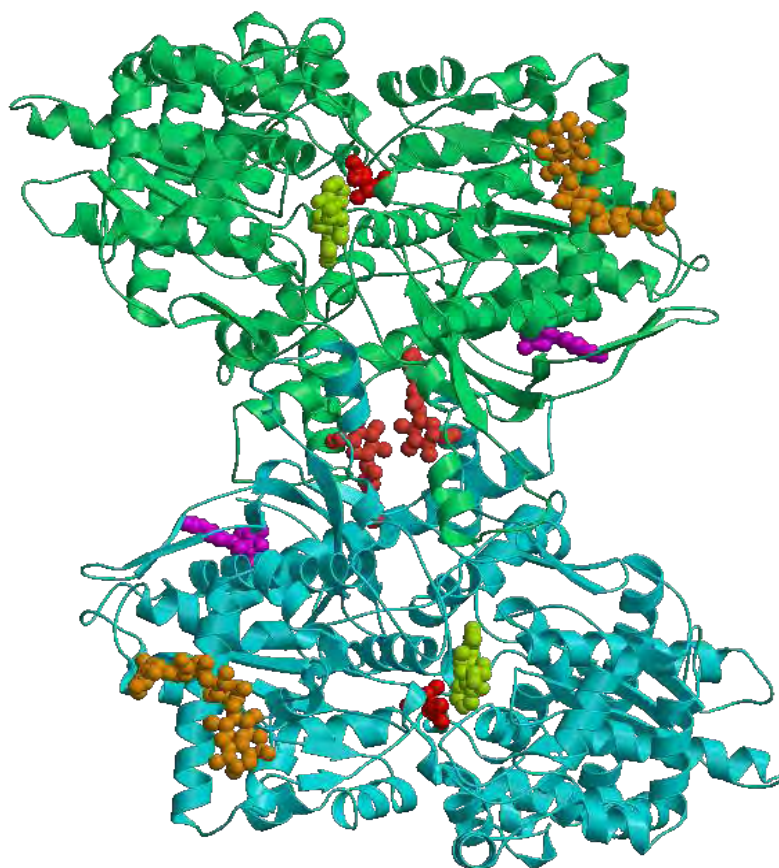
2.3.3 Κρυσταλλική δομή της GP.

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης (Εικόνα 8^η):

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 10). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικά μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των

διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) (Oikonomakos *et al.*, 1992).



Εικόνα 10^η : Σχηματικό διάγραμμα του διμερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοτιδικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα

10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων (Fletterick & Madsen, 1980).

2.3.4 Κέντρα σύνδεσης της GP.

1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο που είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων.(Stryer, 1997)

2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Oikonomakos *et al.*, 1992).

3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση $T \rightarrow R$, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας (Oikonomakos 2001).

4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας (Johnson *et al.*, 1989). Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης (Oikonomakos 2001).

5. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και

ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινoσίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στην ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Oikonomakos *et al.*, 2002).

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP (Oikonomakos *et al.*, 2002). Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων (Sprang *et al.*, 1982).

6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζουλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPβ. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα (Oikonomakos *et al.*, 2002).

3. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου II (Oikonomakos 2001). Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής

φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές. (Somsak et al., 2008). Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ. (Oikonomakos et al., 2008)

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

4. 1. Αρχές ενζυμικής κινητικής.

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{\max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V, ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S, που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P, που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right)$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{\max} Η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_M η σταθερά Michaelis :

$$K_M (\text{σταθερά Michaelis}) = k_1 + k_3/k_2$$

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} . Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles/min/mg}$ πρωτεΐνης)

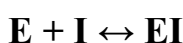
Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η k_{CAT} , που ορίζεται ως $k_{cat}=V_{MAX}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η $k_{cat}=k_3$ όταν $[S] \gg K_M$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου.

4.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων.

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το

περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (με διαπίδυση λ.χ.) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστικότητα του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο ενεργού, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας σε αυτή την περίπτωση δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση.

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:



I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα.

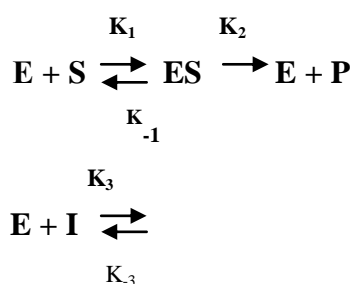
Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI ή με άλλα λόγια, η σταθερά της αμφίδρομης πιο πάνω αντίδρασης, δίνει την σχέση:

$$K_I = \frac{\{EI\}}{\{E\}\{I\}}$$

Η σταθερά Michaelis K_m αποτελεί μέτρο της αγχιστείας ή της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά K_i είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου αναστολέα.

4.2.1 Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση στο υπόστρωμα S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα θα έχει ως εξής:



Εικόνα 10^η: Τρόποι δράσης αναστολέων.

Από την σχέση $[E] = [E]_t - [ES]$ βλέπουμε ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου (E) είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου (E_t) μείον τη συγκέντρωση του ενζύμου που είναι δεσμευμένο με το υπόστρωμα (ES). Στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα θα αναγκαστούμε να ελαττώσουμε τη συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου και κατά το ποσό που είναι ενωμένο με τον αναστολέα I, δηλαδή

$$[E] = [E]_t - [ES] - [EI]$$

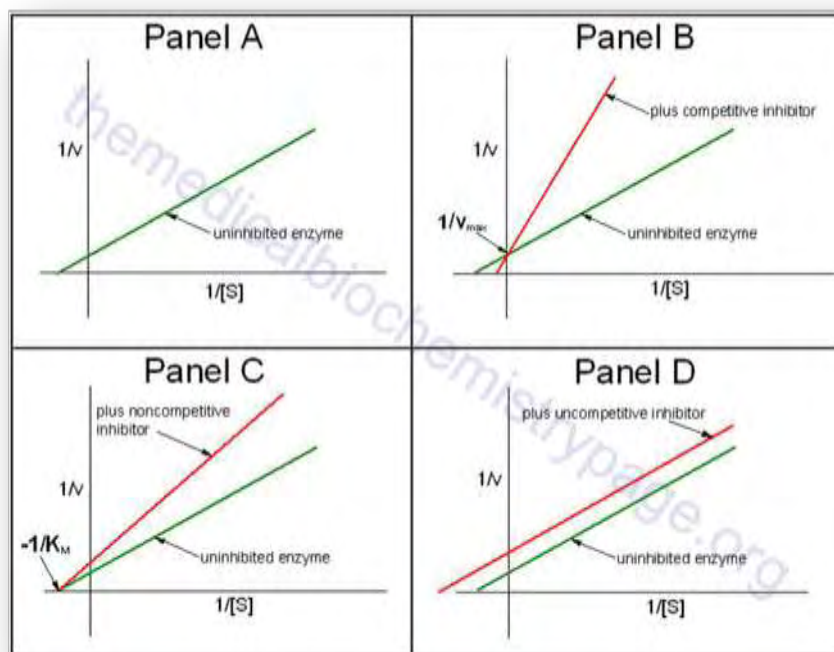
Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής :

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S](1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό $(1 + \frac{[I]}{K_i})$. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγκιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_m να είναι φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η $[S]$ πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της $[I]$, είναι ψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ ψηλή (Ι. Γ. Γεωργάτσος 2001).

Εκτός από την συναγωνιστική αναστολή υπάρχουν:

1. **Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ένζυμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.
2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές διαστάσεως του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS. Έτσι οι K_m και η V_{max} μεταβάλλονται.
3. **Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition)** σε αυτή την περίπτωση αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος.



Εικόνα 11^η: Οι συναγωνιστικοί αναστολείς αυξάνουν την κλίση της καμπύλης σε ψηλότερες τιμές $1/v$ χωρίς όμως να μεταθέτουν το σημείο τομής στην τεταγμένη. Για αυτό η μεν V_{max} παραμένει σταθερή ενώ η K_m αυξάνεται.

5. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Μετά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της μυοσφαιρίνης από τον John Kendrew, της αιμοσφαιρίνης από τον Max Perutz τη δεκαετία του 1950 (σε ευκρίνεια 6.0 Å) και της λυσοζύμης από τον David Philips το 1965 (σε υψηλή ευκρίνεια), ο αριθμός των πρωτεϊνών που προσδιορίζονται με περίθλαση ακτίνων X αυξήθηκε κατά μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα μέχρι σήμερα να έχουν προσδιοριστεί περίπου 8,000 δομές πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Σήμερα η περίθλαση ακτίνων X αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αλλά και άλλων μακρομοριακών συστημάτων. Σε αντίθεση με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) που διεξάγεται σε διαλύματα και η οποία μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν το μέγεθος του μορίου δεν είναι μεγαλύτερο από 30 kDa, η μέθοδος της περίθλασης ακτίνων X μπορεί να εφαρμοστεί σε κρυσταλλικά συστήματα με μοριακό βάρος μέχρι και 10^6 Da. Ωστόσο το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία στην κρυστάλλωση των μακρομορίων.

5.1 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998].

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δυο φάσεις και δίνεται από την σχέση:

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{io} + RT \ln \gamma c_i$$

όπου, μ_{ic} , μ_{is} και μ_{io} είναι τα χημικά δυναμικά στον κρύσταλλο, στο διάλυμα και το πρότυπο δυναμικό αντίστοιχα, ενώ γ είναι η ενεργότητα και c η συγκέντρωση [Ρακιντζή, 1994].

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού i στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ότι στον κρύσταλλο, και εκφράζεται με την παράμετρο β η οποία ονομάζεται βαθμός υπερκορεσμού και ορίζεται ως εξής:

$$\beta = c / c_s,$$

όπου c η συγκέντρωση και c_s η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση, ο βαθμός υπερκορεσμού κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 10, ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος [Mikol & Giege, 1992].

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια:

- **Μετασταθής κατάσταση:** όπου αναπτύσσονται οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι αλλά δεν δημιουργούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης.
- **Ασταθής κατάσταση:** όπου επιτυγχάνεται η αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξή τους.

Κατά την κρυστάλλωση υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα, αντί μιας σαφώς διατεταγμένης κρυσταλλικής δομής. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα [McPherson, 1999].

5.2 Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό ίσως σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους [Acharya & Rees, 1997].

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. **Πυρήνωση.** Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και ορίζεται ως εξής:

$$\Delta G_g = \{-[KT(4r^3\pi)]/ (V\ln\beta)\} + 4r^2\pi\gamma$$

Όπου K: η σταθερά Boltzman,

T: η απόλυτη θερμοκρασία,

r: η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου,

V: ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο,

β : ο βαθμός υπερκορεσμού και

γ : η διφασική ενέργεια διαλύματος- κρυστάλλου [Kam *et al.*, 1978].

Για να μπορέσει να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί ο κρύσταλλος, πρέπει ο βαθμός υπερκορεσμού να είναι αρκετά υψηλός έτσι ώστε το εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων να είναι ικανοποιητικό [Mikol & Giege, 1992]. Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας πυρήνας τότε ξεκινά αυθόρμητα η ανάπτυξή του, ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν [Kam *et al.*, 1978]. Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες [Blundell & Johnson, 1976].

Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πυρήνωσης. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό της κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος [Kam *et al.*, 1978].

2. **Ανάπτυξη πυρήνων.** Μετά το στάδιο της πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με επικάλυψη μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας [Kam *et al.*, 1978].

Ο ρυθμός εναπόθεσης πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται από το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας:

$$dM/ dt = D(dC/ dt)_o S$$

όπου $(dC/ dt)_o$ είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου, S είναι η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής και D ο μέσος συντελεστής διάχυσης. Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη προχωράει μέσω σύνδεσης μονομερών, η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$dM/ dt = K[C_i (0) - C_i] Sd$$

όπου $C_i (0)$ είναι η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού, C_i είναι η συγκέντρωση του διαλύματος και K ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της μορφολογίας του υπό ανάπτυξη κρυστάλλου [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998]

Το στάδιο της ανάπτυξης των κρυστάλλων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια της φωτομικροσκοπίας υπεριώδους ακτινοβολίας [Kam *et al.*, 1978].

3. **Αναστολή της ανάπτυξης.** Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης D είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης K , τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή ότι δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Με βάση διάφορα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναστολή της ανάπτυξης των κρυστάλλων δεν είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης της περιεχόμενης στο διάλυμα πρωτεΐνης. Η αναστολή της

ανάπτυξης οφείλεται στη μεταβολή κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου [Kam et al., 1978]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω της εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά, είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό [Blundell & Johnson, 1976].

5.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας	pH	Καθαρότητα
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Βαρύτητα	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Πίεση	Ιοντική ισχύς	Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση
Ηλεκτρικό / μαγνητικό πεδίο	Αναγωγικό / οξειδωτικό περιβάλλον	/υδρόλυση
Δηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Χημική τροποποίηση
Ιξώδες (viscosity)	Μεταλλικά ιόντα	Γενετικές τροποποιήσεις
Κατάσταση ισορροπίας	Σταυροδεσμοί	Συμμετρία
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων	Απορρυπαντικά/επιφανειο-δραστικές ουσίες/αμφολύτες	Σταθερότητα
κρυστάλλωσης	Προσμίξεις	Ισοηλεκτρικό σημείο
		Ιστορικό δείγματος

Πίνακας 2^ο: Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών [McPherson, 1997].

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί το σημαντικότερο αλλά και το δυσκολότερο στάδιο στην όλη κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου

αριθμού των παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους και στην περιορισμένη γνώση που έχουμε για την πορεία ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος (trial-error method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. Σήμερα έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση, βελτιστοποίηση των συνθηκών αλλά και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται.

Θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας [McMurry, 2001].

pH. Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

Άλατα. Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.
2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.
3. Δρουν με διπολικές – μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.

4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου. Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο και τα γουανιδινικά άλατα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ($C \geq 4 \text{ M}$) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς [McMurry, 2001].

Οργανικοί διαλύτες. Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες ορισμένες φορές μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [McMurry, 2001].

5.4 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα-μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη. Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοιχτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς οργανωμένα και συνδέονται με τις επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα [Blundell & Johnson, 1976].

5.5 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης

5.5.1 Γενικά

Η κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων είναι μια ταχεία μέθοδος αναγνώρισης νέων εν δυνάμει φαρμάκων. Οι μέθοδοι υψηλής απόδοσης που έχουν αναπτυχθεί για την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι πολύ εξελιγμένοι, ενώ οι αντίστοιχοι για την NMR τεχνική βρίσκονται ακόμη σε αρχικά στάδια [Blundell *et al.*, 2002].

Η επίδραση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι διπλή: η επιλογή και η καταλληλότητα του πρωτεϊνικού στόχου μπορεί να είναι πιο ακριβής και ο διαχωρισμός μορίων, που μπορεί να αποτελούν πρόδρομες ενώσεις, αντικαθίσταται από τον σχεδιασμό αυτών των μορίων σε πολύ πιο γρήγορη κλίμακα έτσι ώστε να συμβαδίζει με τις ανάγκες της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Γι' αυτό το λόγο η χρήση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης προκαλεί επανάσταση στη διαδικασία του σχεδιασμού νέων φαρμάκων [Blundell *et al.*, 2002].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πάρα πολλές βελτιώσεις τόσο στο μηχανολογικό κομμάτι όσο και στο λογισμικό των ηλεκτρονικών υπολογιστών με αποτέλεσμα η συλλογή δεδομένων να έχει γίνει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη. Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων εξακολουθούν να είναι δύο από τα βασικότερα στάδια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων που επιβραδύνουν την όλη διαδικασία, κυρίως γιατί το πλήθος των ενώσεων που μελετούνται είναι εξαιρετικά μεγάλο και η επανάληψη των μετρήσεων για την επικύρωση των αποτελεσμάτων είναι επιβεβλημένη. Ωστόσο η χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων ελαχιστοποιεί την ανθρώπινη παρέμβαση και άρα αποκλείει το ανθρώπινο λάθος [Blundell *et al.*, 2002].

Με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης μελετάται ο τρόπος σύνδεσης και οι βασικές αλληλεπιδράσεις των ενώσεων, οι οποίες αν και εμφανίζουν μικρή συγγένεια με το μακρομοριακό στόχο, συνδέονται σ' αυτό με μεγάλη εξειδίκευση. Η έκφραση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών σε ποσότητα και μορφή που απαιτείται για την κρυστάλλωση και την ανάλυση ακτίνων Χ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνητών που ασχολούνται με τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό

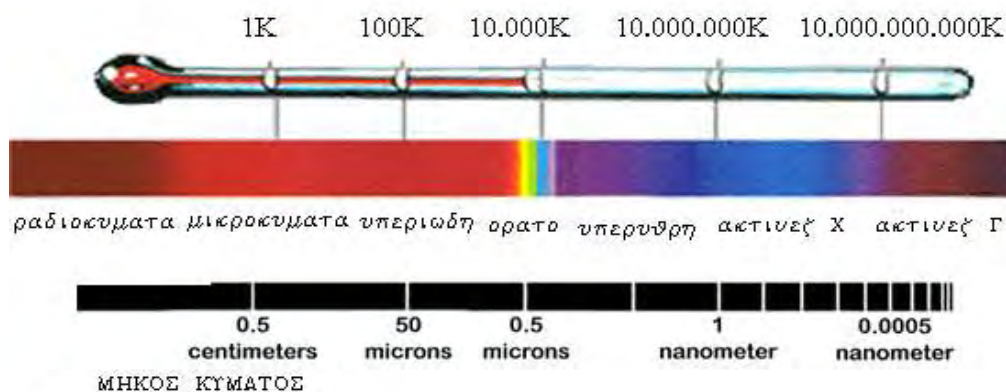
φαρμάκων. Ο αρχικός στόχος είναι η λήψη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία θα δώσει κάποιους καλούς κρυστάλλους. Ο αντικειμενικός στόχος είναι η ανακάλυψη περιοχών οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αναδιπλώνονται και να διαλυτοποιούνται. Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να μην έχουν αλληλουχίες μικρής πολυπλοκότητας, που μπορεί να έχουν περισσότερες από μία διαμορφώσεις και να παρεμβάλλουν στη κρυστάλλωση, αλλά ούτε και μεγάλους βρόχους, οι οποίοι καθιστούν την πρωτεΐνη μη λειτουργική και χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση [Blundell *et al.*, 2002].

Ωστόσο ακόμη και σήμερα, η ανάπτυξη κρυστάλλων καλής ποιότητας, που να μπορούν να δώσουν περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια παραμένει ένα ουσιαστικό πρόβλημα. Κάποια πρωτεϊνικά μόρια δίνουν άριστους κρυστάλλους μόνο μετά από λίγες προσπάθειες ενώ άλλα απαιτούν μερικούς μήνες και για πολλά δεν έχει γίνει δυνατή η κρυστάλλωσή τους. Η βελτίωση της ποιότητας των κρυστάλλων συμβάλλει κατά πολύ στην ακριβέστερη ανάλυση της δομής σε υψηλότερη ευκρίνεια [Acharya & Rees, 1997].

5.5.2. Ακτίνες X (Röntgen)

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 100-0.1Å και ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Conrad Röntgen. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων X στα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες (XRD: X-ray Diffraction) που έχουν τη δυνατότητα να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων και να τις ταυτοποιούν [Τσαγκάρης, 1999].

Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και αποτελεί μέρος του συνολικού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Εικόνα 12).

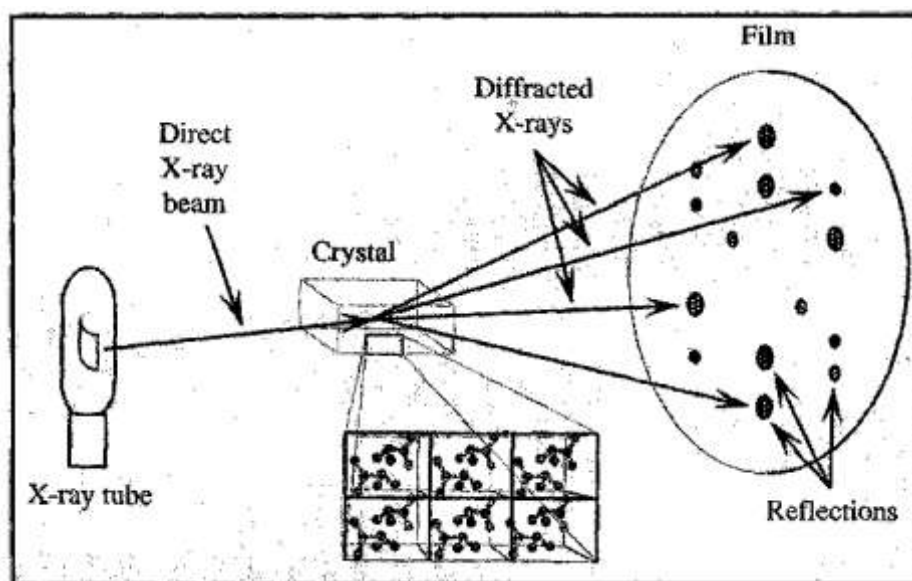


Εικόνα 12^η: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Ακτίνες X παράγονται όταν ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλες ταχύτητες χτυπήσουν υλικά. Τότε ένα μέρος της κινητικής τους ενέργειας μετατρέπεται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της περιοχής των ακτίνων X. Το υπόλοιπο μετατρέπεται σε θερμότητα. Οι ακτίνες X ανιχνεύονται από τα αποτελέσματά τους. Έχουν ισχυρή φωτοχημική δράση που μαυρίζει τις φωτογραφικές πλάκες, προκαλούν ισχυρό φθορισμό, ιονίζουν τα αέρια και έχουν έντονη βιολογική δράση. Μπορούν να προκαλέσουν εγκαύματα και οι πολύ «σκληρές» ακτινοβολίες (μικρού μήκους κύματος) μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή στις κληρονομικές ιδιότητες προσβάλλοντας τα γονίδια των χρωμοσωμάτων του πυρήνα των κυττάρων [Τσαγκάρης, 1999].

5.5.3. Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων X απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων X. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων X.



Εικόνα 13^η: Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτίνες που προσπίπτουν στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα), τα ηλεκτρόνια περιθλούν ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων.

Πηγές ακτίνων X

Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια είδη πηγών, οι συμβατικές πηγές που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) και μετάπτωση ηλεκτρονίων μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) προκαλούν σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα του φωτός και να αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή κατεύθυνσης.

Στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές, οι ακτίνες X παράγονται από μια λυχνία με υψηλό κενό (περίπου 10^{-7} mmHg), η οποία περιέχει μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως χαλκός, Cu, αλλά και μολυβδαίνιο, Mo). Μια πηγή υψηλής τάσης (20-70kV) συνδέει την άνοδο με την κάθοδο ενώ το θετικό δυναμικό της πηγής συνδέεται με την άνοδο. Η άνοδος ψύχεται διότι η υψηλή τάση θερμαίνει γρήγορα το μεταλλικό έλασμα. Ο συνηθέστερος τρόπος ψύξης της ανόδου είναι με τη χρησιμοποίηση νερού ενώ αποτελεσματική ψύξη πραγματοποιείται και με τη χρησιμοποίηση περιστρεφόμενης ανόδου, όπου το

μέταλλο περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφεύγεται η άνοδος της θερμοκρασίας σ' ένα μόνο σημείο [Τσαγκάρης, 1999].

Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργειες της τάξης των 10^5 eV ($1\text{eV} = 1.6 \times 10^{-19}$ Joule) ικανές να παράγουν ακτίνες X στην άνοδο [Τσαγκάρης, 1999].

Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος.

Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα. Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές (sharp).

Μία άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η ρύθμιση του μήκους κύματος (tunability). Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων X μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες X μήκους κύματος 1\AA ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [Rhodes, 1993].

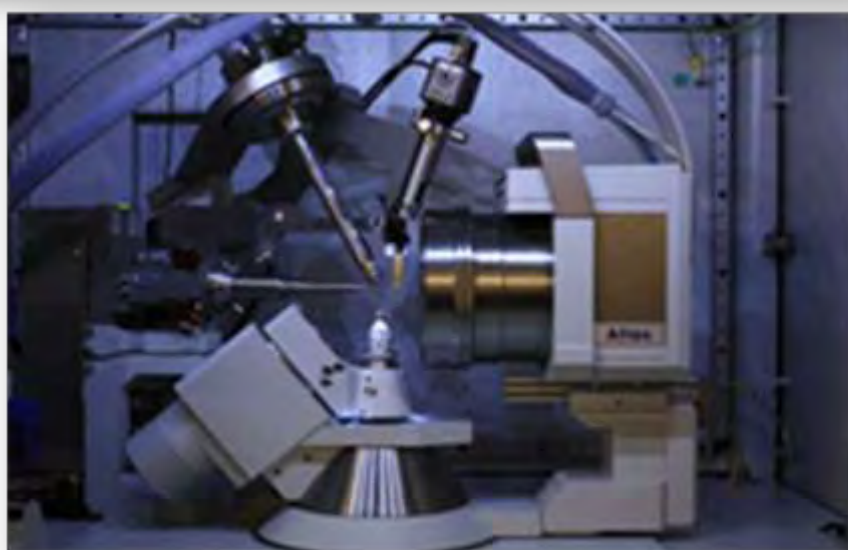
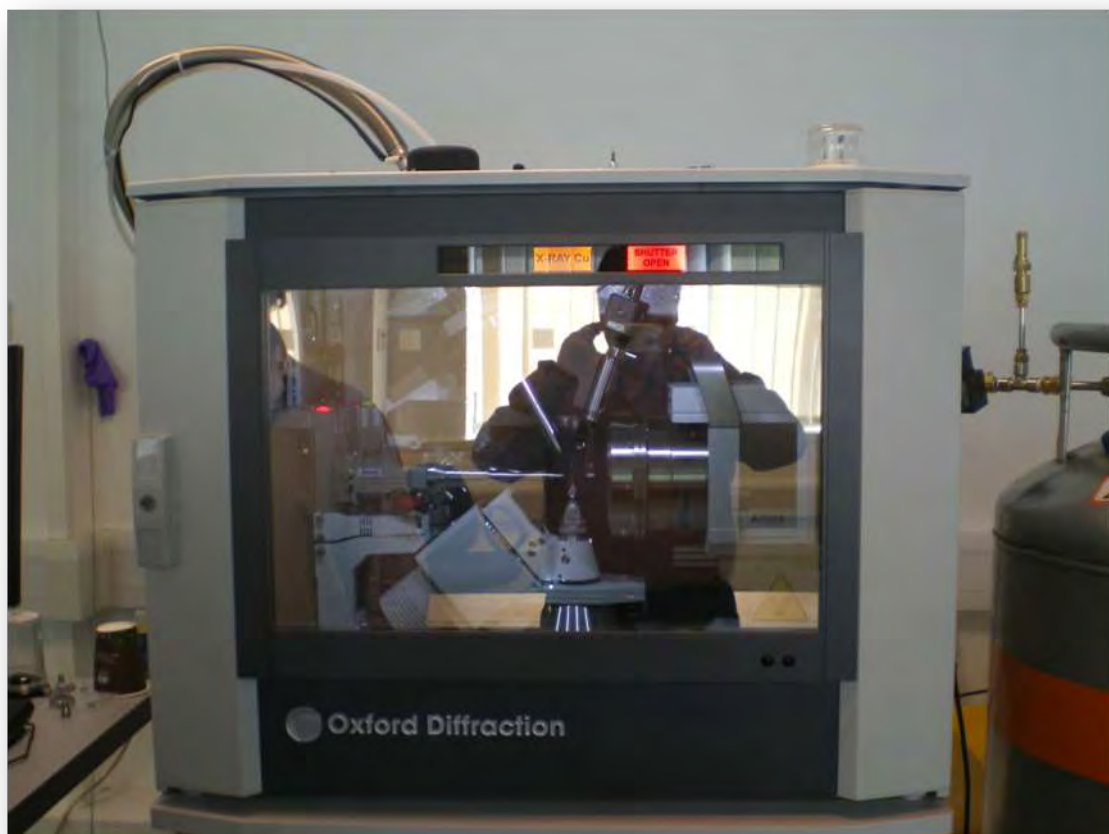
Η πρόσβαση στις συγχροτρονικές ακτίνες X είναι πολύ σημαντική. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Έτσι είναι δυνατή η περίθλαση ακτίνων X από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Αυτό φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα η συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία να είναι κεφαλαιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα, απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία

για αρκετές ώρες ενώ σήμερα αρκούν λίγα μόλις λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, συμβάλλει πολύ σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου, όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σχέση σήματος-θορύβου. Η χρήση μικρών γωνιών επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων δεδομένων στο ίδιο φιλμ. Η νεκρή περιοχή του πλέγματος, που είναι απρόσιτη κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα, είναι αναλογικά μικρότερη απ' ό,τι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος [Ζωγράφος, 2000].

Ανιχνευτές ακτίνων X [Dreath, 2002]

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων X απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ένα μεγάλο ποσοστό) των σκεδαζόμενων ακτινών. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας $1/\lambda$ (σφαίρα του Ewald, βλέπε παρακάτω), με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

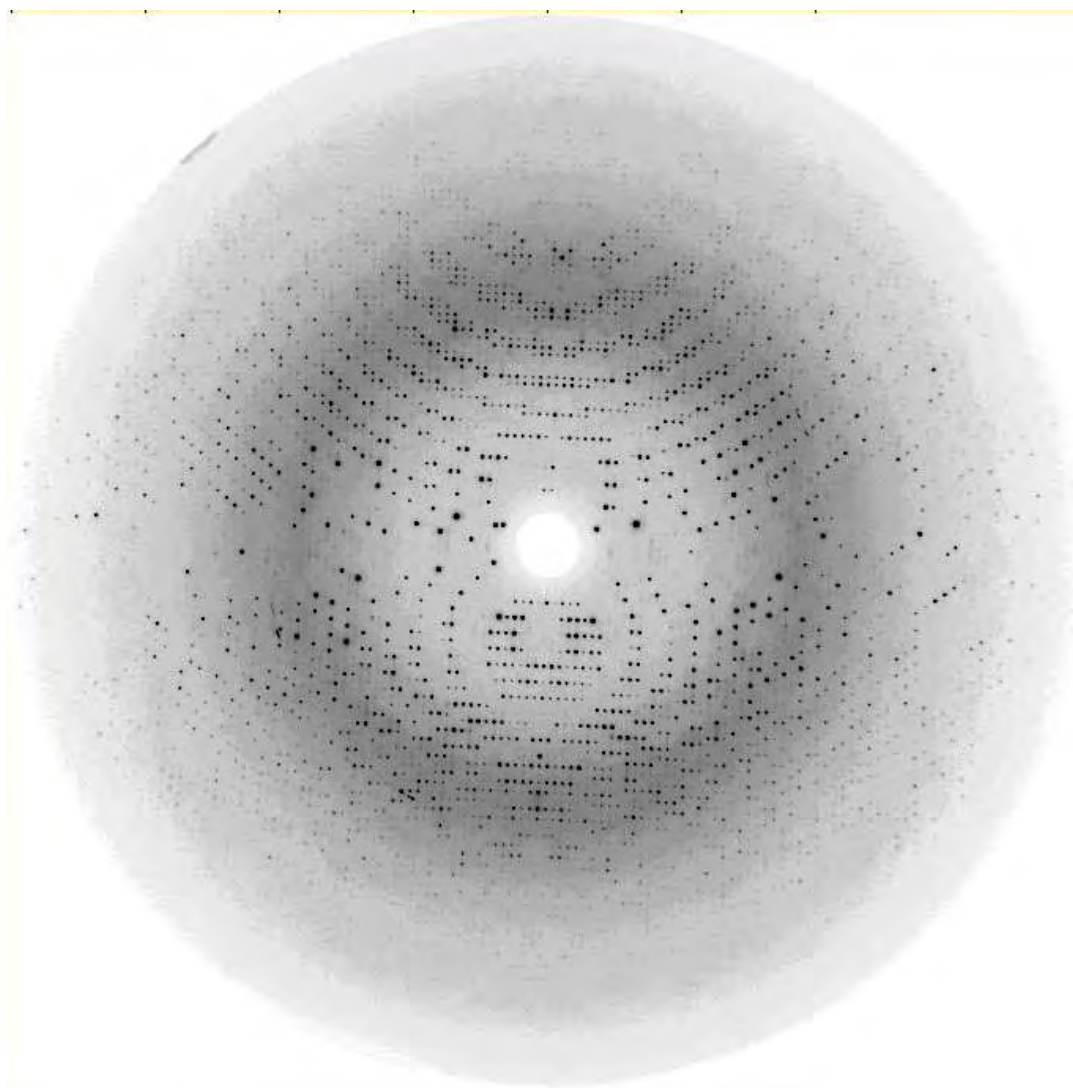
1. Το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου
2. Μία συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης της κάθε περιθλώμενης ακτινοβολίας.



Εικόνα 14^η: Σύσκευή κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Κάτω: γωνιόμετρο τοποθετημένο στη ειδική θέση.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα γίνεται με συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου (Εικόνα 15).

Οι ανιχνευτές πεδιάς (area detectors) (παρόλο που το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές ανιχνεύουν περιοχή, ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση 0.1° δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους image plate ανιχνευτές που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων, πολλαπλασιαστή εικόνας (image intensifier) συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (charge coupled device).



Εικόνα 15^η : Παράδειγμα περιθλασιγράμματος. Το συγκεκριμένο περιθλασίγραμμα προέκυψε από περίθλαση ακτίνων Χ κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

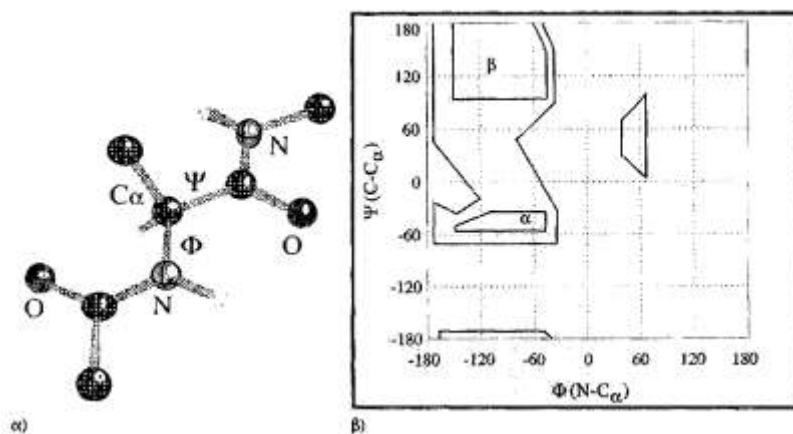
5.5.4. Έλεγχος του δομικού μοντέλου

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος αυτού έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφόρων στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικοί δεσμοί,

δίδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση) [Τσιτσάνου, 2001].

Διάγραμμα Ramachandran

Η στερεοχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι δίδρες γωνίες ϕ και ψ για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως αυτό που φαίνεται στο Σχήμα β. Ο G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος ϕ και ψ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία.



Εικόνα 16^η: α) Ορισμός των ϕ (Cα-N) και ψ (Cα-C) δίδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμμα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α-έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια [Rhodes].

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από της μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα.

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης μικρομοριακών αναστολέων από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή, ει δυνατόν ατομική, ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \Leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πορείας αυτής και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική και κρυσταλλογραφική μελέτη ενώσεων που έχουν ως στόχο το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη δύο αναλόγων πουρινών, της υποξανθίνης και της αλλοπουρινόλης, για τον προσδιορισμό της K_i έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου και στη συνέχεια

προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου ενζύμου-υποξανθίνης προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου

Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται η εύρεση ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou and Oikonomakos, 1983].

Υλικά:

- Κουνέλια (3 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)
- Υαλοβάμβακας
- Διηθητικά χαρτιά

Όργανα:

- ❖ Νυστέρια για την αποκοπή των σκελετικών μυών των κουνελιών
- ❖ Μηχανή πολτοποίησης
- ❖ Πιπέτες Pasteur
- ❖ Φυγόκεντρος
- ❖ Πεχάμετρο
- ❖ Φασματοφωτόμετρο
- ❖ Χρονόμετρο
- ❖ Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσες με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρωση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ,

για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διανγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστο 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης ($\beta\text{-GP/Merc/EDTA}$, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

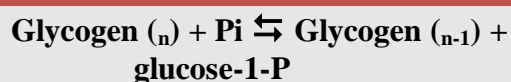
Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 280 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 13.2$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm (Kastenschmidt, et al., 1968).

2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου (**Glycogen**(_n)), προς **Glycogen** (_{n-1}) και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης (**glucose-1-P**).



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P).

Αντιδραστήρια και διαλύματα

- Ρυθμιστικά διαλύματα.
 - ❖ β -GP (50 mM), β -μερκαπτοαιθανόλη πυκνή (50 mM), EDTA (1mM) pH 6.8. Χρησιμοποιήθηκε για αραιώσεις του ενζύμου
 β -φωσφογλυκερόλη, $C_3H_7Na_2O_6P$, MB 306,12 g/mol (MERCK)
 β -μερκαπτοαιθανόλη, C_2H_6OS , MB 78,3 g/mol (SERVA)
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$, MB 372,5 g/mol (SERVA)
 - ❖ imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) pH 6.8
ιμιδαζόλιο
χλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA) η μεγάλη συγκέντρωση του KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$, MB 372,5 g/mol (SERVA)
Διθειοθρεϊτόλη, DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξείδωση του ενζύμου ή μικροετερογένεια κατά την κρυστάλλωση.

- διάλυμα α-D-G-1-P 400mM
α-D-1-φωσφορική γλυκόζη, α-D-G-1-P, $C_6H_{10}O_9PNa_2$, MB 376.06 g/mol
(SIGMA)

- διάλυμα γλυκογόνου 10% w/v
γλυκογόνο (oyster glycogen) (SIGMA).

Πιθανές προσμίξεις νουκλεοτιδίων απομακρύνθηκαν σύμφωνα τη μέθοδο των Helmreich & Cori (1964), η οποία περιελάμβανε:

α) Κατεργασία με ενεργό άνθρακα.

β) Φυγοκέντρωση στους 0- 4 °C.

γ) Διήθηση με φίλτρα Whatman N_o1.

δ) Καταβύθιση με 1.5 όγκο απόλυτης αλκοόλης.

ε) Διήθηση υπό κενό και λυοφίληση στους -20 °C για 12 – 15 ώρες.

Το στερεό διαλυτοποιήθηκε στον κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος, ώστε η τελική συγκέντρωση του γλυκογόνου να είναι 10% w/v.

Φυλάσσεται στους -20 °C.

- Διάλυμα AMP 50mM pH 6.8
5'-φωσφορική αδενοσίνη, AMP MB 347.2 g/mol (SIGMA)

- Διάλυμα SDS 1% w/v
Δωδεκακυλοθειικό νάτριο, SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MB 288,38 g/mol,
(SIGMA)

- Διάλυμα ενζύμου GPb

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου pH 5.0

Μολυβδαινικό αμμώνιο, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, MB 1236,86 g/mol
(MERCK)

Οξικός ψευδάργυρος, $Zn(CH_3COO)_2$, MB 219,49 g/mol (SIGMA)

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH 5.0

L(+)ασκορβικό οξύ, $C_6H_8O_6$, MB 176,13 g/mol (MERCK)

- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Φωτόμετρο, Ορατού-υπεριώδους
- Φασματοφωτόμετρο, **Novaspec II spectrofotometer**, (Pharmacia Biotech)
- Υδρόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30°C)
- Χρονόμετρο
- Πιπέτες, **Gilson P1000-P10** (Gilson, France)
- Αναδευτήρας

Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και με pH6.8.

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και pH6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος GLC-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 40.5mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

- Glc-1-P 18mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί η φυσική υδρόλυση της Glc-1-P.

Πορεία:

Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε 50% γλυκερόλη παίρνουμε μικρή ποσότητα και το αραιώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα β-GP (50 mM), β-Merc (50 mM), EDTA (1mM) pH 6.8 προς όγκο 1ml. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm, αφού προηγουμένως έχει γίνει ρύθμιση μηδενικής απορρόφησης με το ρυθμιστικό διάλυμα ($\Pi = A \times L / \epsilon$, Π σε mg/ml, $L = 1$ cm, $\epsilon = 1,32$ ml \times cm/mg και A η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280nm, η οποία οφείλεται στους αρωματικούς δακτυλίους των αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης του ενζύμου).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται διάλυμα το οποίο περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια σε τελικές αναλογίες:

- GPb 25μg/ml
- Γλυκογόνο 1% w/v
- Ρυθμιστικό διάλυμα β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM

Παρασκευή διαλυμάτων με διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα τελικού όγκου 720μl και pH6.8 με ανάμιξη των προαναφερθέντων διαλυμάτων Glc-1-P και διαλύματος AMP 50mM

1. Glc-1-P 25.00mM, AMP 1.25mM
2. Glc-1-P 12.50mM, AMP 1.25mM
3. Glc-1-P 7.50mM, AMP 1.25mM

4. Glc-1-P 5.00mM, AMP 1.25mM
5. Glc-1-P 2.50mM, AMP 1.25mM

2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστικότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον (pH 5.0) παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα για την εκτέλεση αυτής της μεθόδου:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.
- Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς διάλυμα ασκορβικού οξέος.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από

15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της K_m του ενζύμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου.

Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τη ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση Glc-1-P που χρησιμοποιείται και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της Glc-1-P στις άλλες συγκεντρώσεις του πειράματος
- Τυφλό γνωστού πρότυπου διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων

Παρασκευάζονται τουλάχιστο από δύο τυφλά για κάθε περίπτωση εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεών τους, ενώ αν η χρονική διάρκεια ενός πειράματος (όπως σε περιπτώσεις που εξετάζεται κάποιος αναστολέας) κρίνεται μεγάλη, τότε φτιάχνονται δύο σειρές τυφλών από τουλάχιστο δύο δείγματα η κάθε μία, οι οποίες μετριοούνται η μία στην αρχή του πειράματος και η άλλη στο τέλος από όπου λαμβάνεται και πάλι ο μέσος όρος των τιμών.

Εκτέλεση πειράματος

Το διάλυμα του ενζύμου με το γλυκογόνο τοποθετείται για επώαση στους 30°C εντός του υδρόλουτρου για 15min. Μετά την πάροδο 10min από την αρχή της διαδικασίας στο υδρόλουτρο τοποθετούμε και τα διαλύματα των διαφόρων συγκεντρώσεων της Glc-1-P και τα αφήνουμε για 5 min. Μετά την επώαση, 180 μl ενζυμικού διαλύματος εισάγονται στους σωλήνες των υποστρωμάτων (διαλύματα Glc-1-P) με όγκο διαλύματος 720 μl για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες που

λαμβάνει χώρα η αντίδραση το pH είναι 6.8, η θερμοκρασία 30°C και οι διάφορες συγκεντρώσεις:

- α -D-G-1-P 20mM, 10mM, 6mM, 4mM, 3mM, 2mM
- GPb 5μg/ml
- Γλυκογόνο 0,2% w/v
- AMP 1mM
- Imidazole 30mM
- KCl 60mM
- DTT 0.6mM
- EDTA ~0.6mM
- β -GP 0.1mM
- Merc 0.1mM

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (1, 2, 3 και 4 min) λαμβάνονται 200μl από το μείγμα της αντίδρασης και εισάγονται σε σωληνάκια τα οποία περιέχουν 50 μl SDS 1% w/v. Παρουσία του απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται με συνέπεια να σταματά η αντίδραση.

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου με τη μέθοδο ασκορβικού οξέος: σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το μείγμα της αντίδρασης καθώς και στα τυφλά βάζουμε 2.5ml του διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου-ασκορβικού οξέος και μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται για 15min εντός του υδρόλουτρου (30°C).

Τέλος μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος σε μήκος κύματος 850 nm και καταγράφονται οι τιμές.

2.3 Προσδιορισμός K_i αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Η σταθερά Michaelis K_m αποτελεί μέτρο της αγχιστείας ή της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά K_i είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου αναστολέα.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α -D- Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} .

α) Υπολογισμός των ειδικών δραστηριοτήτων–αρχικών ταχυτήτων(v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ^2)

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή $1\mu\text{mol}$ υποστρώματος ή παραγωγή $1\mu\text{mol}$ προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow, 1992) εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι κάθε πειραματική τιμή εμπεριέχει τυχαίο σφάλμα, δηλαδή η τυπική απόκλιση (σ^2) είναι σταθερή (simple weighting) (Leatherbarrow, 1990). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molP}_i} \right) \text{όριο} / \text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$

όπου k : είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

t : ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

β) Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{\max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ^2)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{\max}).

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten, οι ενζυμικές ταχύτητες επεξεργάζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$



Όπου : v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

V_{\max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

3.Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 280nm 260nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι ~ 0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την στατιστική μέθοδο [Oikonomakos et al, 1985]. Η στατιστική μέθοδος αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

- Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
 - Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
 - Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
 - Πυρήνες κρυστάλλωσης

- Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 mm και μήκους 3 cm

ΟΡΓΑΝΑ:

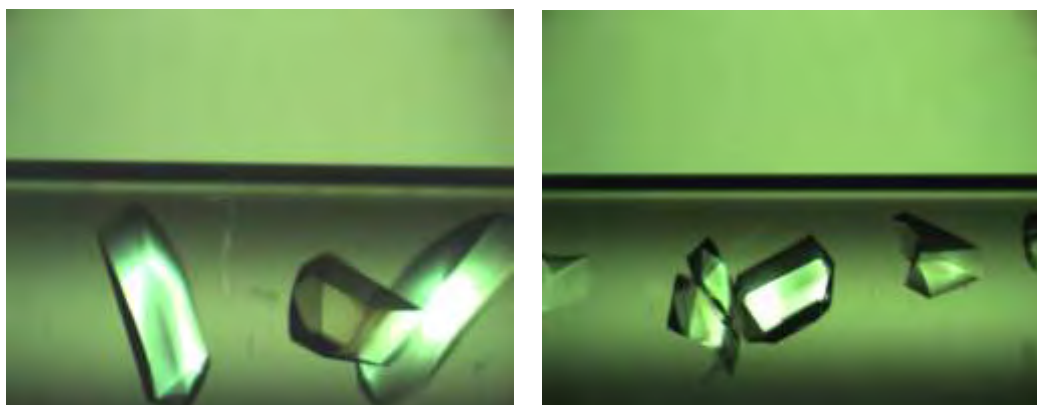
❖ Φασματοφωτόμετρο UV

Πορεία:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου $P4_32_12$) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$). Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN_3 στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραίωσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



Εικόνα 17^η: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση.

4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.

ΥΛΙΚΑ:

- Διάλυμα αναστολέα
- Κρύσταλλοι GPb
- Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
- Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)
- Κερί
- Σύριγγες

ΟΡΓΑΝΑ:

- ❖ Στερεοσκόπιο
- ❖ Πιπέτες Pasteur

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των εν δυνάμει αναστολέων έχει σαν σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των ενώσεων που υπέδειξαν τα κινητικά πειράματα.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο- αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες

εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. ~2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X

Η έκθεση μονοκρυστάλλου πρωτεΐνης σε ακτίνες X έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία και την ελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης αυτής ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί με ειδικούς ανιχνευτές και να γίνει συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα περιθλασιγράμματα αυτά αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα, από τα οποία, μετά από κατάλληλη επεξεργασία και συγχώνευσή αυτών με ειδικό λογισμικό για κρυσταλλογραφικές μελέτες, υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.

Υλικά:

- Μονοκρύσταλλος

Όργανα:

- ❖ Πηγή ακτίνων X (X-ray tubes CuK α , $\lambda=1,54184\text{\AA}$,
- ❖ Ανιχνευτής πεδιάς
- ❖ Γωνιόμετρο

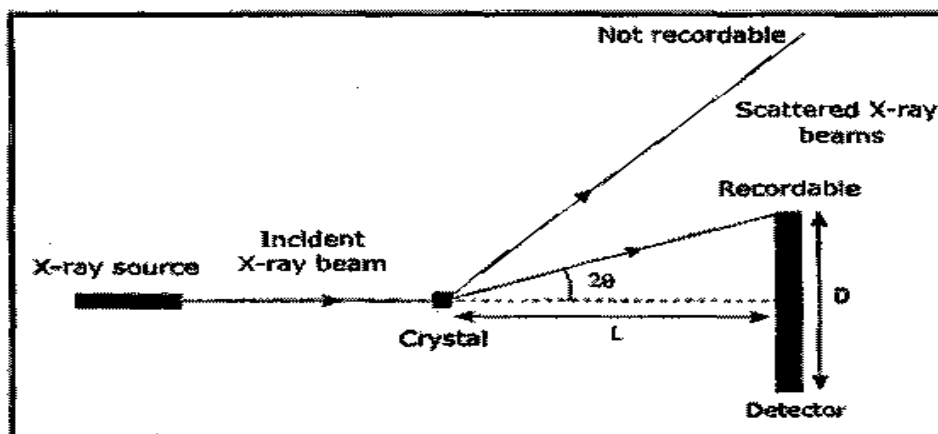
Πορεία:

Ο κρύσταλλος που βρίσκεται στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετείται στο γωνιόμετρο και στη συνέχεια το όλο σύστημα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα στον ανιχνευτή και την έξοδο της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίζεται ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιομέτρου.



Εικόνα 18^η: Τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας (λ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου (d), χρόνος έκθεσης (t), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στην εικόνα 19 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων X.



Εικόνα 19^η: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πειραματικής διάταξης περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία 2θ και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση L από το κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από τον νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία θ (2θ αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση L , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια [Rhodes, 1993].

Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθεση του κρυστάλλου και η λήψη των περιθλασιγραμμάτων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο EMBL-Hamburg Oustation, με την χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Ταυτόχρονα γίνεται και η αρχική επεξεργασία τους με το πρόγραμμα, MOSFLM όπου η κάθε εικόνα επεξεργάζεται ξεχωριστά (ταξινόμηση κηλίδων) και στη συνέχεια οι εικόνες συγχωνεύονται. Η συγχώνευση μας δίνει την πληρότητα αλλά και τη ποιότητα των δεδομένων.

6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

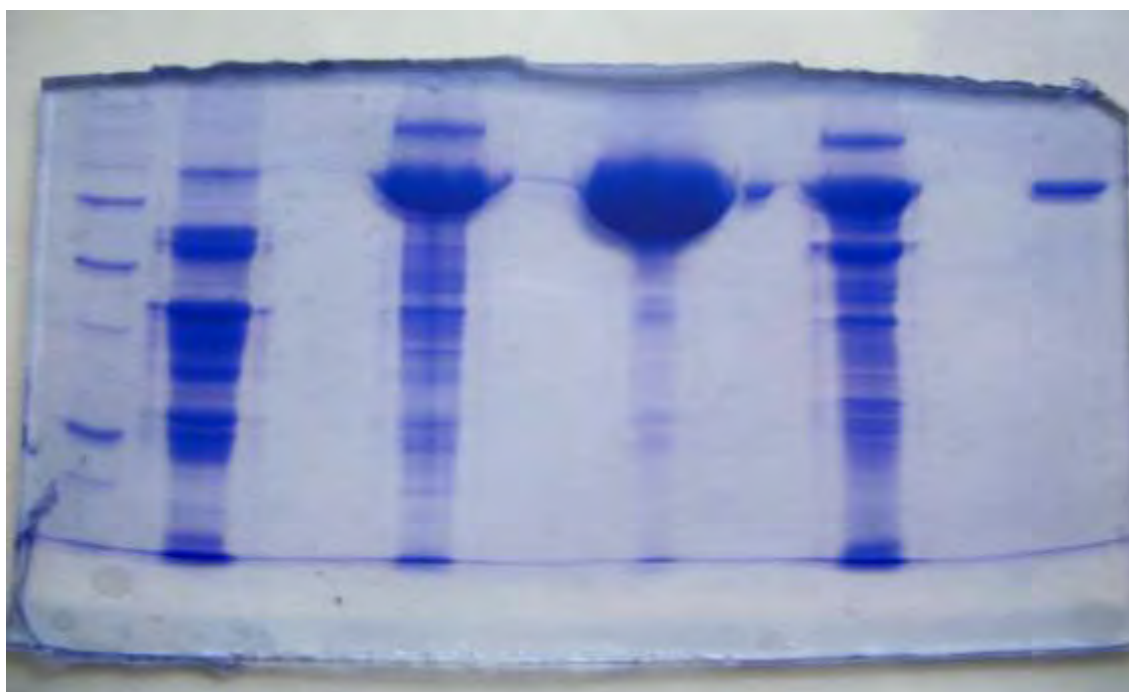
Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποτελεί κυρίως τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2Fo-Fc$, $Fo-Fc$ (Fo : πειραματικοί δομικοί παράγοντες, Fc : θεωρητικοί δομικοί παράγοντες του μοντέλου), την βελτιστοποίηση του αρχικού μοντέλου της δομής της πρωτεΐνης με κύκλους βελτιστοποίησης (ακολουθώντας το πρωτόκολλο που υπαγορεύεται από το πρόγραμμα REFMAC) (CCP4, 1994).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).

Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή 4 Διαδρομή 5



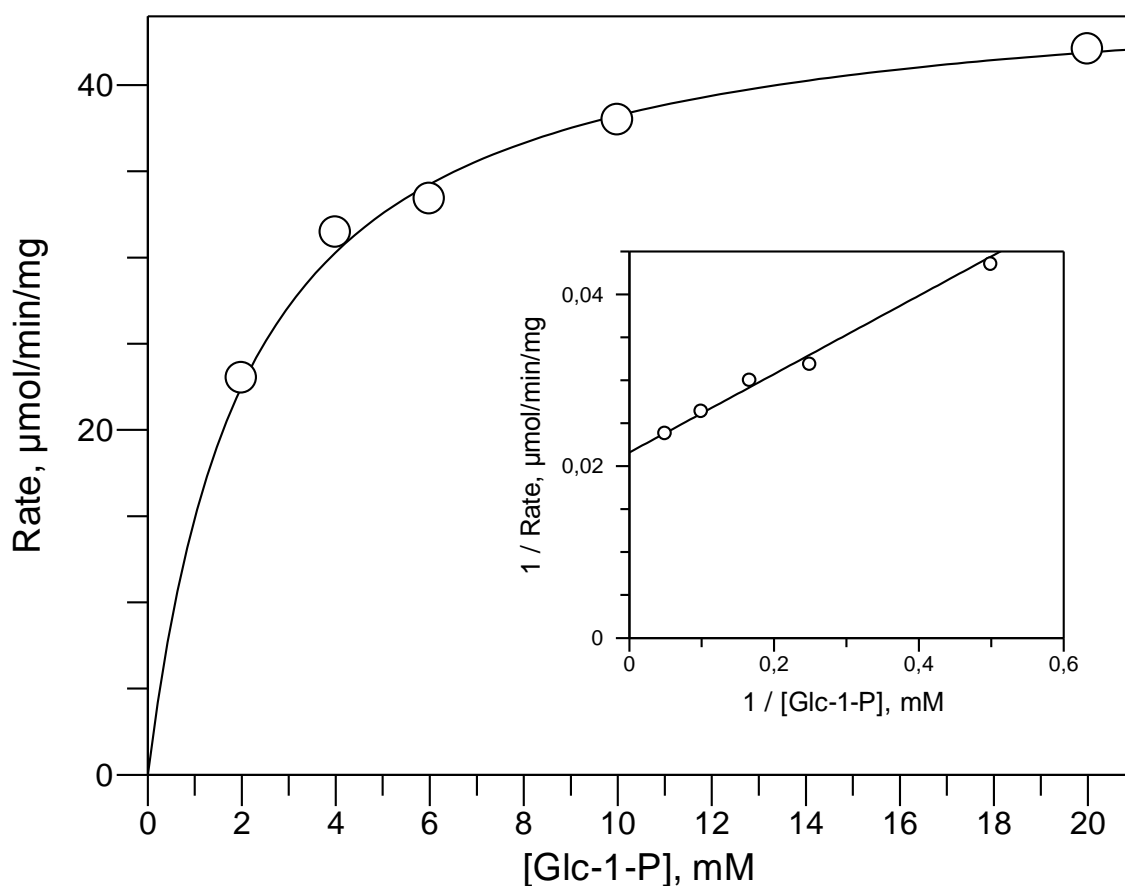
Εικόνα 20^η: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPh. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . (βλ. Πειραματικό μέρος)

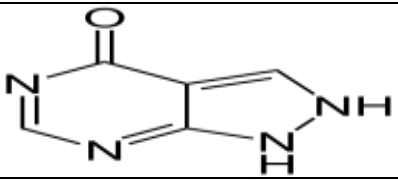
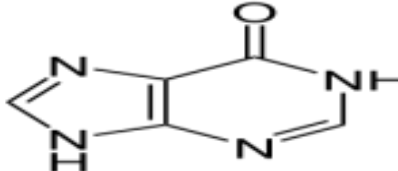
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=2.11 \pm 0.14$ mM και $V_{max}=46.32 \pm 0.61$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο σχήμα 21 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P). Επειδή, δεν είναι πάντοτε δυνατό να καθοριστεί, τότε επιτυγχάνεται η V_{max} , γιατί η καμπύλη σχήματος υπερβολής, έχει βαθμιαία ανοδική κλίση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, αν παρασταθεί γραφικά η $1/v_0$ ως προς την $1/[S]$, τότε λαμβάνεται ευθεία γραμμή (**Lineweaver-Burk**). Το διάγραμμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της K_m και της V_{max} .



Εικόνα 21^η: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου (**Lineweaver-Burk**) από όπου υπολογίζονται οι τιμές $V_{\text{max}}=46.3 \pm 0.6 \mu\text{mol/mg/min}$ και $K_m=2.1 \pm 0.1 \text{ mM}$.

2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων αλλοπουρινόλη και υποξανθίνη.

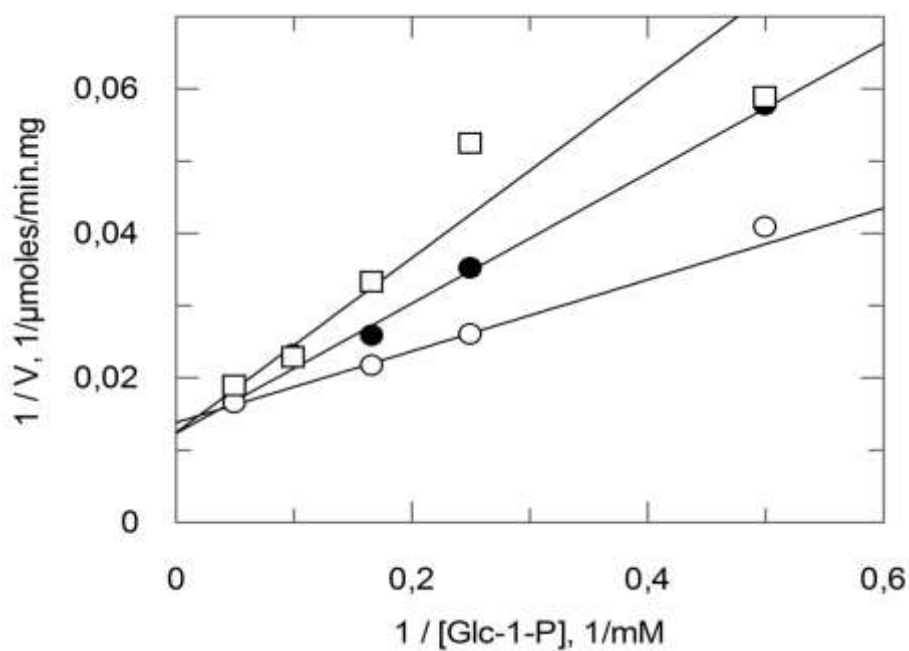
Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκαν οι ενώσεις αλλοπουρινόλη και υποξανθίνη ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow, 1997)

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	K_i (mM)
Αλλοπουρινόλη		200μM, 500μM, 1mM, 2mM	1.06 ± 0.23
Υποξανθίνη		1mM, 1.5 mM, 2 mM, 3,5 mM	2.98 ± 0.12

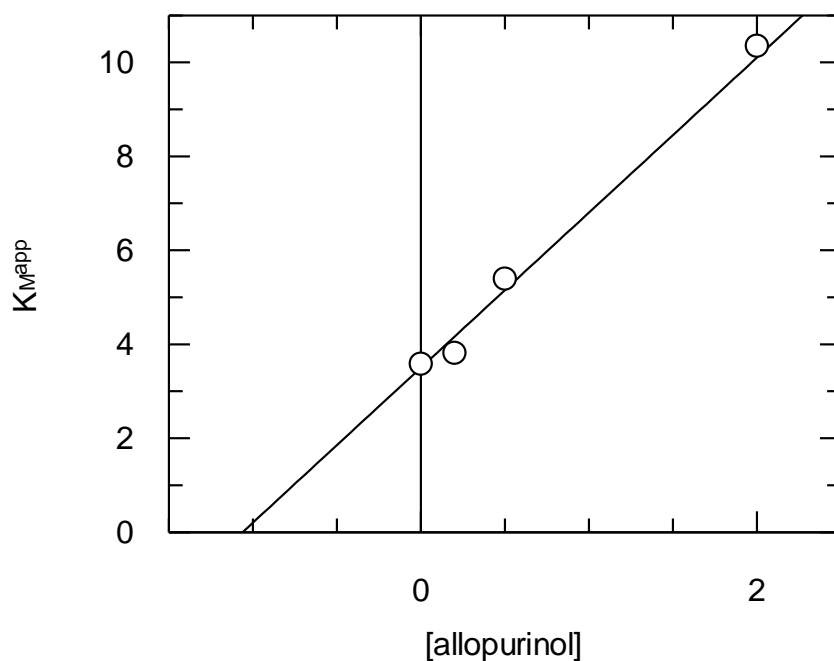
Πίνακας 3^{ος}: Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Αλλοπουρινόλη

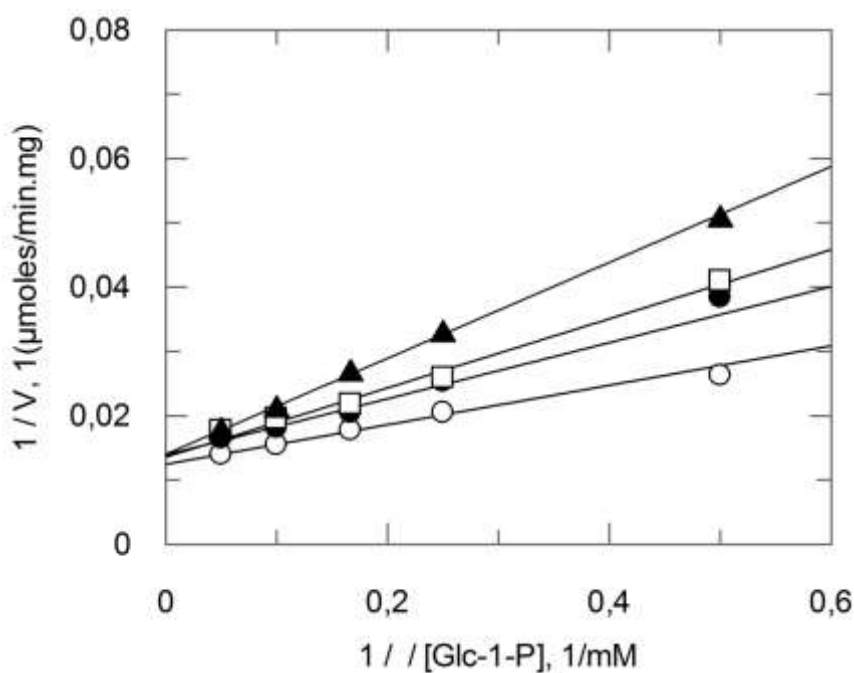


Εικόνα 22^η: Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk της αναστολής της φωσφορυλάσης από την ένωση της αλλοπουρινόλης. Επειδή τέμνονται στον άξονα ψ σημαίνει πως είναι συναγωνιστική αναστολή.

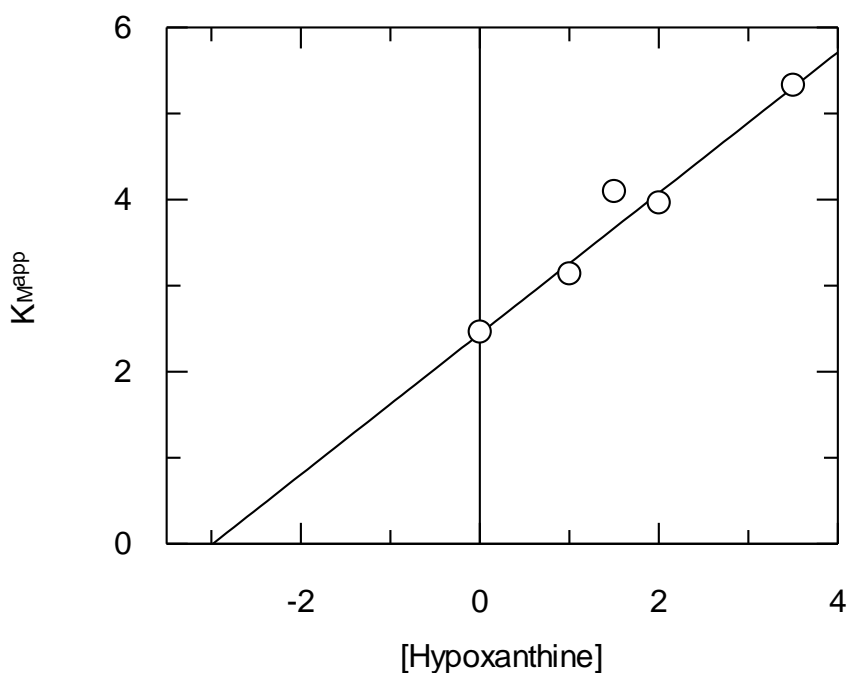


Εικόνα 23^η: Καμπύλη της K_m^{app} ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλλοπουρινόλης και υπολογισμός της K_i

➤ **Υποξανθίνη**



Εικόνα 24^η : Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk της αναστολής της φωσφορυλάσης από την ένωση της υποξανθίνης. Επειδή τέμνονται στον άξονα ψ σημαίνει πως είναι συναγωνιστική αναστολή.



Εικόνα 25^η: Καμπύλη της K_m^{app} ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της υποξανθίνης και υπολογισμός της K_i .

Η υποξανθίνη όπως και η αλλοπουρινόλη αποτελούν ανάλογα πουρινών που συναντώνται περιστασιακά στα νουκλεϊκά οξέα. Η υποξανθίνη έχει βρεθεί σε μόρια tRNA πολλών κυτταρικών πληθυσμών, βακτηρίων και παρασίτων, αποτελώντας πηγή αζώτου για αυτά. Η αλλοπουρινόλη είναι δομικό ισομερές της υποξανθίνης και αποτελεί αναστολέα του ενζύμου οξειδωση της ξανθίνης. Τα νουκλεοτίδια είναι ζωτικής σημασίας για ένα πλήθος βιοχημικών διεργασιών. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι διαταραχές στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων μπορεί να έχουν ποικίλες επιπτώσεις στη φυσιολογία του οργανισμού.

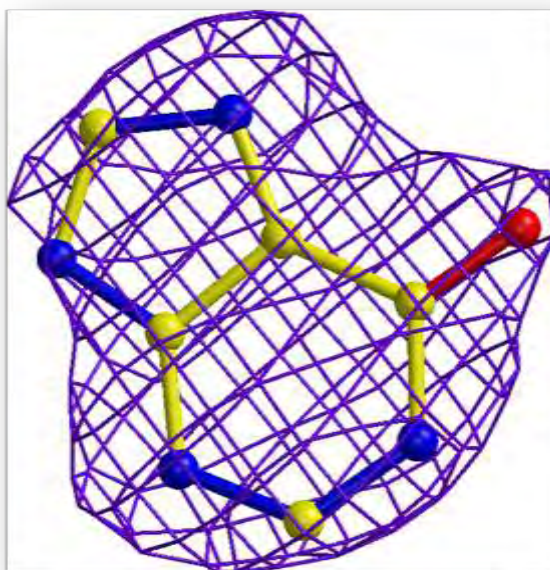
Τα νουκλεοτίδια ενός κυττάρου υφίστανται διαρκώς ανακύκληση. Μερικές από τις βάσεις επαναχρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν νουκλεοτίδια με πορεία πέριψης. Άλλες αποικοδομούνται σε προϊόντα τα οποία εκκρίνονται. Η AMP αποικοδομείται προς ελεύθερη βάση υποξανθίνης διά μέσου απαμίνωσης και υδρολυτικής διάσπασης του γλυκοζιτικού δεσμού. Η οξειδάση της ξανθίνης, μια φλαβινοπρωτεΐνη που περιέχει μολυβδαίνιο και σίδηρο, οξειδώνει την υποξανθίνη προς ξανθίνη και στη συνέχεια προς ουρικό οξύ. Το ουρικό οξύ χάνει ένα πρωτόνιο σε συνθήκες φυσιολογικού pH για να σχηματίσει ουρικό ιόν. Στον άνθρωπο το ουρικό ιόν είναι το τελικό προϊόν της αποικοδόμησης πουρινών και απεκκρίνεται με τα ούρα. Υψηλά επίπεδα ουρικού ιόντος στον ορό του αίματος προκαλούν ουρική αρθρίτιδα (ποδάγρα), μια ασθένεια κατά την οποία άλατα ουρικού κρυσταλλώνονται

και καταστρέφουν τις αρθρώσεις και τους νεφρούς. Η αλλοπουρινόλη, ως αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, χρησιμοποιείται σε μερικές περιπτώσεις για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας (Stryer 1997).

3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την περαιτέρω μελέτη του τρόπου σύνδεσης της μίας εκ των ενώσεων, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων. Βρέθηκε ότι οι ουσίες που χρησιμοποιήσαμε ως αναστολείς δεσμεύονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας, τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων (Πινάκας 4^{ος}). Στη συνέχεια η δομή της χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου. Όπως φαίνεται από την ηλεκτρονική πυκνότητα (Εικόνα 24^η) η υποξανθίνη συνδέεται ισχυρά στο κέντρο αναστολής.



Εικόνα 26^η. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της υποξανθίνης στο κέντρο αναστολής της GPb

Όπως φαίνεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα (Εικόνα 24) η υποξανθίνη συνδέεται ισχυρά στο κέντρο αναστολής.

Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Πείραμα

10 mM υποξανθίνη

Ομάδα χώρου συμμετρίας

P4₃2₁2

Πλήθος εικόνων ($\Delta\phi^\circ$)

154 (0.8°)¹

Διαστάσεις κυψελίδας (Å)

a=b=126.6, c=115.8

Ευκρίνεια (Å)

89.49-2.30

Συνολικός αριθμός περιθλάσεων

1475361

Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων

42587

$\langle I / \sigma(I) \rangle$ (εξωτερική στοιβάδα)²

12.8 (2.8)

B-factor (Wilson plot) (Å²)

35.8

Πληρότης δεδομένων (εξωτερική στοιβάδα) (%)

98.5 (99.7)

R_{merge} (εξωτερική στοιβάδα)³

0.125 (0.474)

Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.34-2.30
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	4.6 (4.8)
Βελτιστοποίηση συμπλόκου	
Τελικό στάδιο βελτιστοποίησης (ευκρίνεια)(εξωτερική στοιβάδα) (Å)	28.8-1.97
Αριθμός χρησιμοποιούμενων περιθλάσεων (ελευθ.)	39497 (2100 ελευθ.)
Αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στη βελτιστοποίηση	13-251, 261-314, 325-836
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6565
Αριθμός μορίων ύδατος	474
Αριθμός ατόμων μικρών μορίων	15 (PLP)
	10 (υποξανθίνη)
	24(DMSO)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})^4$ (%)	21.2 (29.4)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d) μήκους δεσμών (Å)	0.016
Μέση απόκλιση (r.m.s.d) γωνίας δεσμών (°)	1.835
B (Å ²) για τα αμινοξέα	13-251, 261-314, 324-837
Σύνολο της δομής	27.2
CA, C, N, O	26.0
Πλευρικές αλυσίδες	28.4
<i>Μέση τιμή θερμικής παραμέτρου B (Å²) για τους αναστολείς</i>	
PLP	17.5
Υποξανθίνη	53.8
DMSO	45.1
H ₂ O	29.3

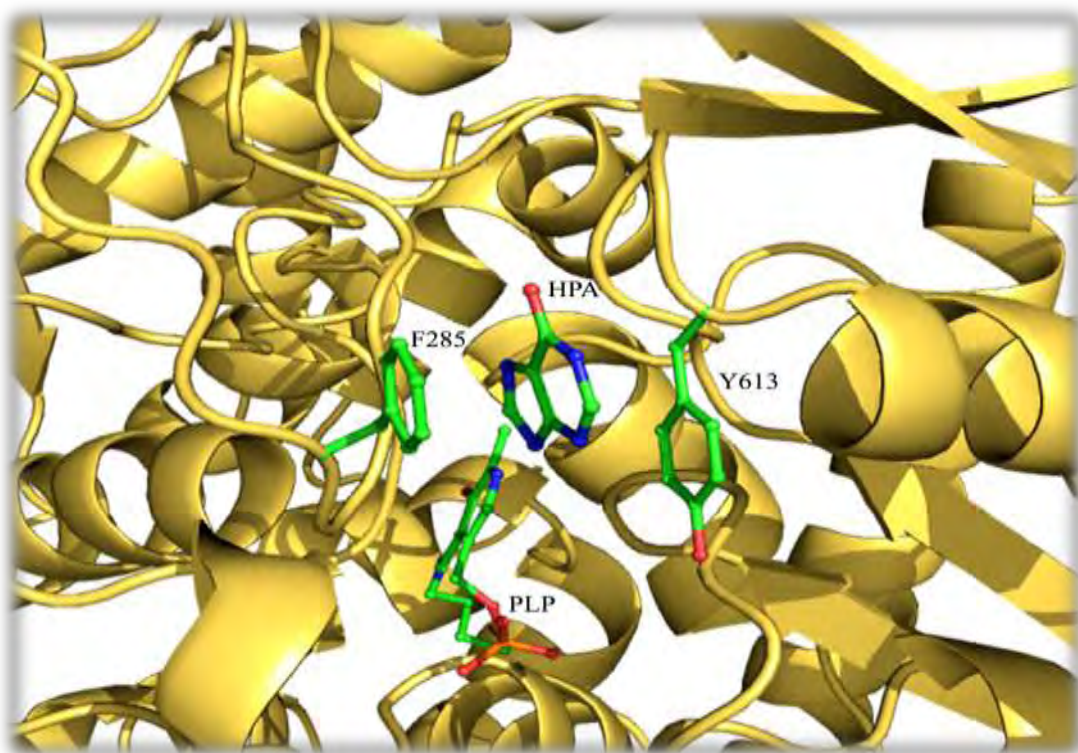
¹0.8 είναι το εύρος περιστροφής ανά εικόνα.

² $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση του I .

³ $R_{merge} = \sum_i \sum_h | < I_h > - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ όπου $< I_h >$ και I_{ih} είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h , αντίστοιχα.

⁴Ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας $R = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, όπου $|F_o|$ και $|F_c|$ είναι τα παρατηρούμενα και υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων αντιστοίχως. Ο R_{free} είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R για το 5% των κρυσταλλογραφικών δεδομένων το οποίο επιλέγεται τυχαία και δεν συμπεριλαμβάνεται στη βελτιστοποίηση.

Πίνακας 4^{ος}. Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου T διαμόρφωσης GPb-υποξανθίνη



Εικόνα 27^η: Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης της υποξανθίνης (HPA) στο κέντρο αναστολής. Η παρουσία της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) μας υποδεικνύει την θέση εισόδου του μορίου στο κέντρο αναστολής.

Το κυριότερο χαρακτηριστικό που παρουσιάζει η υποξανθίνη κατά την σύνδεση της στην πρωτεΐνη είναι οι αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης που αναπτύσσονται ανάμεσα στους αρωματικούς δακτυλίους και της υποξανθίνης και τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe285 και Tyr613, ενώ παράλληλα το μόριο δεν σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου (Εικόνα 25). Η υποξανθίνη κατά την σύνδεση της στη GPb αναπτύσσει συνολικά 57 Van der Waals αλληλεπιδράσεις (48 μεταξύ μη πολικών ομάδων και 14 μεταξύ μη πολικών και πολικών ομάδων) με τα αμινοξέα του κέντρου αναστολής. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals καταγράφονται στον Πίνακα 4.

Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της υποξανθίνης (HPA) και αμινοξέων του κέντρου αναστολής της GPb.	
Άτομο HPA	Άτομο GPb
O6	Tyr613 N, Phe285 CZ, CE2, CD2, Gly612 C, O,
C6	Tyr613 CB, CA, Phe285 CE1,CZ, CE2, CD2, Gly612 O
N1	Phe285 CE1, CZ, CE2, Gly612 O
C5	Tyr613 CB, CG, Phe285 CB, CG, CD1, CE1, CZ, CE2, CD2
N7	Tyr613 CB, Ala610 CB, Phe285 CB, CD2, CG
C8	Asp283 O, Tyr613 CD1, Phe285 CG, CD1, CB
N9	Tyr613 CG, Tyr613 CE1, CD1, Phe285 CB, CG, CD1
C4	Tyr613 CB, Tyr613 CG, CD1, CD2 Phe285 CG, CD1, CE1,
N3	Tyr613 CG, Phe285 CD1, CE1, CE2, CD2
C2	Phe285 CE1, CZ, Tyr613 CD2
Σύνολο	57
Αμινοξικά κατάλοιπα	4

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη δύο ενώσεων, αναλόγων πουρινών, για τον προσδιορισμό της K_i και στη συνέχεια προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου του ενζύμου με τον πλέον ισχυρό αναστολέα από αυτούς που μελετήθηκαν προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών έδειξαν πως και οι δύο ουσίες συνδέονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η κρυσταλλογραφική μελέτη της αλλοπουρινόλης βρίσκεται σε εξέλιξη έτσι ώστε να ληφθούν συμπεράσματα για την ικανότητα της να αναστέλλει το ένζυμο GPb

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ :

- 1 Γρηγοροπούλου Ε. & Φιλιππόπουλος Κ., (1998). Τεχνική Χημικών Διεργασιών, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- 2 Ζωγράφος Σ. Ε. (2000). Κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες των ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης: Δομικός και καταλυτικός ρόλος του συνενζύμου 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου και μοριακή αναγνώριση. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- 3 McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- 4 Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- 5 Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
- 6 Παπαϊωάννου Ι., 2004, Σημειώσεις Χημείας Στερεάς Καταστάσεως, Αθήνα.
- 7 Ρακιντζής Θ. Ν., 1994, Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- 8 Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- 9 Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- 10 Τσαγκάρης Γ., 1999, Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- 11 Τσιτσάνου Α., 2001, Διδακτορική διατριβή, Σχεδιασμός αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

ΕΕΝΗ:

- Acharya R. & Rees A. R. (1997). Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Volume 6, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 275-282.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Blundell T. L. & Johnson L. N. (1976). Protein Crystallography, Academic Press, London.
- Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., 2002, High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.
- Brunger A. T., 1992, Free R value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystals. *Nature*, 355, 472-475.
- Brunger, A.T., 1993, Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* 49, 24-36.
- Brunger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T. & Warren G. L., 1998, Crystallography and NMR system; A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr.*, 5, 802-810.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4), 1994, The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.*, D50, 760-763.
- Cori C. F. & Cori G. T., 1936, Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34, 702-705.
- Davis A.M., Teague S.J. and Kleywegt G.J. 2003, Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew.Chem. Int. Ed.*, 42, 2718-2736.
- Diamond J., 2003, The double puzzle of diabetes, *Nature*, 423, 599-602.
- Drenth, J., 2002, Principles of protein x-ray crystallography, Springer, New York.
- Fiske C. H. & Subbarow Y., 1925, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fletterick R. J. & Madsen N. B., 1980, The structures and related functions of phosphorylase α , *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 31-61.

- Johnson L. N. & Hajdu J., 1989, Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, *Biophysics & Synchrotron Radiation*, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.
- Kam Z., Shore H. B. & Feher G., 1978, On the crystallization of proteins, *J. Mol. Biol.*, 123, 539-555.
- Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J. and Szczepankiewicz B.G. 2003. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 123-153.
- Leatherbarrow, R. J., 1990, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- McPherson, A., 1997, *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G., 1983, Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase α , *FEBS Lett.*, 154, 105-110.
- Mikol V. & Giege R., 1992, *The physical chemistry of protein crystallization; Crystallization of Nucleic acids and proteins. A practical approach*, Decruix A. & Giege R. eds, IRL Press.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.

- Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., 1985, Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., 1992, Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.
- Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., 2000, Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*, 7, No 9, 677-682.
- Rhodes G, 1993, *Crystallography made crystal clear*, Academic Press Inc., London.
- Rossman, M.G., Arnold, E., 2001, *International Tables of Crystallography*, Vol. F, The international union of crystallography.
- Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.
- Segel, L.H., 1975, *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.

- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., 1982, Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for α -D-glucose, *Biochemistry*, 21, 5364-5371.
- Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., 1982, Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for α -D-glucose, *Biochemistry*, 21, 5364-5371.
- Taylor, G., 2003, The phase problem *Acta Crystallogr.*, D59, 1881-1890.
- Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425.
- Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.